

# Povezanost centralnog glutamatnog sustava s antinociceptivnim učinkom botulinum toksina tipa A

---

**Blažević, Luciano**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2017**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:992765>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-13**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Luciano Blažević**

**Povezanost centralnog glutamatnog sustava s  
antinociceptivnim učinkom botulinum toksina  
tipa A**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmakologija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmakologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Lidije Bach-Rojecky.

*Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Lidiji Bach-Rojecky na velikoj i nesebičnoj pomoći pruženoj prilikom izrade ovoga diplomskog rada te na prenesenom znanju tijekom studija koje je uvelike potaknulo moje zanimanje za farmakologiju. Srdačno se zahvaljujem i Višnji Drinovac Vlah, mag.pharm., znanstvenoj novakinji Zavoda za farmakologiju, na pomoći tijekom eksperimentalnog dijela diplomskog rada i kasnije obrade rezultata. Posebnu zahvalu upućujem svojim roditeljima i obitelji na svim oblicima podrške, razumijevanju i vjeri u mene.*

# **SADRŽAJ**

<b>1.UVOD</b> .....	1
1.1. Patofiziologija boli.....	1
1.1.1. Receptori za bol i putovi prijenosa bolnih signala u CNS.....	3
1.1.2. Značajni neurotransmiteri u nocicepciji.....	4
1.1.3. Periferna i centralna senzitivizacija.....	5
1.2. Glutamat i njegova uloga u nocicepciji.....	6
1.2.1. Antagonisti glutamatnih receptora u liječenju boli.....	9
1.3. Botulinum toksin .....	10
1.3.1. Struktura botulinum toksina tipa A.....	10
1.3.2. Mehanizam djelovanja botulinum toksina tipa A.....	11
1.3.3. Mehanizam antinociceptivnog djelovanja botulinum toksina tipa A.....	13
1.4. Klinička primjena botulinum toksina.....	14
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	15
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	16
3.1. Životinje.....	16
3.2. Ispitivane tvari: BT-A i AP5.....	16
3.3. Eksperimentalni model boli:formalinski test.....	16
3.4. Eksperimentalni protokol.....	17
3.5. Statistička obrada rezultata.....	18
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	18
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	23
<b>6. LITERATURA</b> .....	24
<b>7. SAŽETAK/SUMMARY</b> .....	31
<b>8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA</b> .....	33
<b>9. BASIC DOCUMENTATION CARD</b> .....	34

## 1.UVOD

### 1.1.Patofiziologija boli

Prema definiciji Međunarodnog udruženja za istraživanje boli, bol je neugodan osjetni i osjećajni doživljaj povezan sa stvarnim ili potencijalnim oštećenjem tkiva.

Već sama definicija ističe složenost osjeta boli, u čije je nastajanje uključeno ne samo mjesto ozljede već i različite strukture središnjeg živčanog sustava (SŽS). Budući da se bolna informacija koja stiže s mjesta ozljede obrađuje u različitim regijama mozga te dodatno ima kognitivne elemente, smatra se da je cijeli mozak centar za bol. Ako je po jakosti i trajanju neprimjerena oštećenju tkiva, odnosno ako traje i nakon završetka procesa cijeljenja, bol postaje patogenetski čimbenik koji se povezuje s promjenama raspoloženja poput depresije, produbljanja osjećaja nemoći i pogoršanja osnovne bolesti, a može uzrokovati i dodatna oštećenja tkiva aktivacijom simpatikusa i poticanjem/održavanjem upale. Razlikujemo dvije glavne vrste boli prema njezinom utjecaju na organizam, a koje u stvarnosti interreagiraju; fiziološku (adaptacijsku) bol kojom se organizam prilagođava na štetne okolišne faktore ili ih izbjegava kao moguću prijetnju, te patološku (maladaptacijsku) bol koja nadilazi trajanje oštećenja tkiva, kroničnog je trajanja i uzrokuje nesvrhsihodnu patnju oboljelih. Bolni impulsi ne provode se samo u somatosenzornu regiju velikog mozga, već i u druga područja poput hipotalamusa i prefrontalnog korteksa te je na taj način bol povezana s osjećajima, stresom i pamćenjem, što rezultira pratećim stanjima poput tjeskobe, strepnje, potištenosti, mučnine i povraćanja. Integracija bolnog osjeta uključuje četiri povezana procesa: transdukciju (nastajanje „bolnog“ akcijskog potencijala u perifernim okončinama senzornih neurona), kondukciju (provođenje bolnog akcijskog potencijala duž senzornih neurona), transmisiju (prenošenje akcijskog potencijala na druge neurone i daljnje širenje u više centre) i percepciju (doživljaj osjeta boli s emocionalnom komponentom) (Gamulin i sur., 2011).

Različiti molekularni i stanični mehanizmi unutar perifernog i/ili središnjeg živčanog sustava pridonose nastanku i trajanju boli. Za neka bolna stanja još uvijek nisu poznati mehanizmi nastanka, niti mehanizmi održavanja kronične boli.

Bol se može podijeliti na različite načine: s obzirom na trajanje, patofiziologiju, intenzitet, simptome, lokalizaciju itd. S obzirom na trajanje, razlikujemo akutnu i kroničnu bol.

Akutna bol počinje brzo i obično je oštro i probadajućeg karaktera. Tipični primjeri su posjekotine i bol nakon operacije ili porođaja.

Ako se ne ukloni uzrok akutne boli, ona može prijeći u kroničnu koja traje dulje od 3 mjeseca.

Prema patofiziologiji možemo razlikovati nociceptivnu, upalnu i neuropatsku bol.

Nociceptivna bol posljedica je izravnog podraživanja nociceptora mehaničkom silom, toplinom, hladnoćom ili kemijskim agensima, obično bez pratećeg oštećenja tkiva. Aktiviraju se TRPV1 (*engl., transient receptor potential cation channel subfamily V*) receptori ili ionski kanali poput ASIC (*engl., acid sensing ion channels*) kanala na perifernim okončinama C i A $\delta$  vlakana. Aktivacija TRPV1 receptora rezultira lokalnim lučenjem glutamata iz perifernih okončina, koji onda djeluje preko AMPA (AMPA- $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kiselina), NMDA (N-metil-D-aspartat) i kainatnih receptora.

Novonastali akcijski potencijal se prenosi u kralježničku moždinu gdje se aktiviraju sljedeći neuroni u osjetnom putu. Ukoliko je podražaj dovoljno jak, luči se i supstanca P (SP) koja je spori neurotransmiter te preko neurokininskih NK1 receptora pojačava postsinaptičku ekscitaciju spinalnih neurona.

Upalna bol je posljedica ozljede tkiva i upale. Upale i ozljede tkiva uzrokuju mnoge promjene u mikrookolišu nociceptora. Iz stanica oko nociceptora izlučuju se brojni upalni medijatori: prostaglandini, leukotrieni, vodikovi ioni, ATP, bradikinin, histamin itd. Razlikujemo aktivatore i senzitizerore nociceptora. Dok aktivatori izravno depolariziraju osjetne završetke i dovode do nastanka akcijskog potencijala, senzitizerori djeluju posredno, potičući lučenje SP, NGF (*engl., nerve growth factor*), polipeptida gena za kalcitonin (CGRP, *engl., calcitonin gene-related peptide*) i drugih medijatora koji uzrokuju vazodilataciju, propusnost kapilara, veću adhezivnost leukocita na endotel krvnih žila itd., te na taj način aktivno sudjeluju u upali. Kod kronične upalne boli može doći i do promjena fenotipa A $\beta$ -vlakana koja uobičajeno ne provode bolne impulse, ali se uslijed ponavljalog podraživanja mijenjaju te poprimaju neke karakteristike C-vlakana, poput ekspresije SP. Pretpostavlja se da navedene promjene uzrokuju povećanu osjetljivost na bolne podražaje (hiperalgeziju) i osjetljivost na podražaje koji nisu bolni (alodinija).

Neuropatska bol je dugotrajna i kronična maladaptacijska bol i nema ulogu prilagođavanja uzroku boli. Posljedica je oštećenja živčanog sustava, a prateći je simptom ili posljedica mnogih bolesti i stanja poput šećerne bolesti, alkoholizma, ozljede kralježničke moždine i sl. U patogenezi neuropatske boli sudjeluju vrlo kompleksni periferni i centralni mehanizmi koji uključuju ne samo procese senzitizacije (povećanja osjetljivosti) nociceptivnog puta na svim razinama, već i promjene transkripcije gena i posttranslacijske promjene (Gamulin i sur., 2011; Bach-Rojecky, 2006).

### 1.1.1. Receptori za bol i putovi prijenosa bolnih signala u SŽS

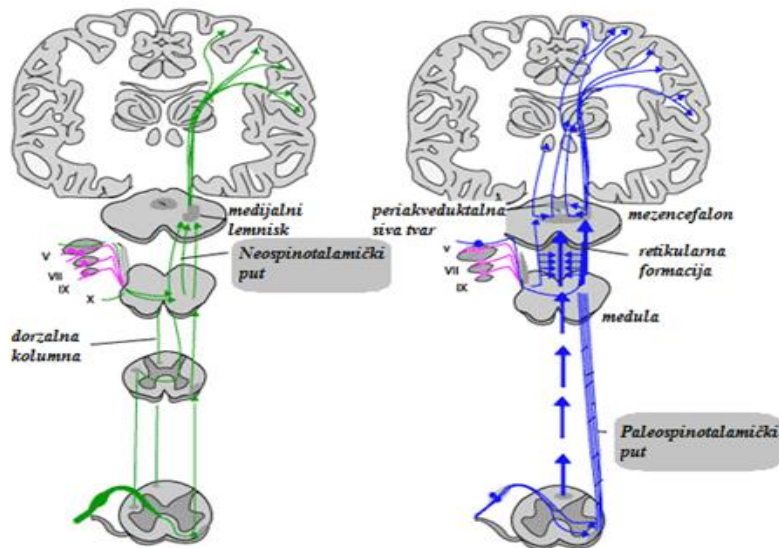
Receptori za bol ili nociceptori su slobodni periferni živčani završeci aferentnih mijeliniziranih A $\delta$  i nemijeliniziranih C vlakana. Imaju visoki prag podražaja. A $\delta$  vlakna provode brzu, dobro lokaliziranu bol brzinom između 6 i 30 m/s. Za razliku od njih, nemijelinizirana C vlakna provode sporu, slabo lokaliziranu bol puno manjom brzinom, između 0,5 i 2 m/s. Zbog tog dvostrukog sustava inervacije receptora za bol, brzi bolni podražaj često uzrokuje dvostruk osjet boli (Gamulin i sur., 2011). Većina C i A $\delta$  nociceptora iz unutarnjih organa su neosjetljivi na bolne podražaje u fiziološkim uvjetima, tj. u neupaljenom tkivu. Aktiviraju se upalnim medijatorima i postaju osjetljivi na mehaničke podražaje (Bach-Rojecky, 2006).

Nociceptore mogu aktivirati mehanička sila, hladnoća, toplina, kemijske tvari. Receptori na živčanim okončinama su kationski kanali koje otvaraju gore navedeni čimbenici. Aktivacijom receptora i otvaranjem kanala propuštaju se Na<sup>+</sup> i Ca<sup>2+</sup> ioni u periferne završetke aksona što uzrokuje depolarizaciju membrane i potiče otvaranje Na<sup>+</sup> kanala reguliranih naponom te se posljedično stvara akcijski potencijal. Potom dolazi do kondukcije, tj. širenja akcijskog potencijala kroz akson prema centralnim završecima senzornog neurona u dorzalnom rogu kraljezničke moždine, gdje se bolni impuls prenosi na sekundarne senzorne neurone izravnim monosinaptičkim prijenosom ili preko interneurona koji mogu biti facilitacijski ili inhibicijski. Aksoni sekundarnih neurona uzlaznim putovima prenose bolne signale u mozak, i to neospinotalamičnim ili paleospinotalamičnim traktom (Gamulin i sur., 2011).

Brza vlakna A $\delta$  uglavnom prenose mehaničku akutnu termalnu bol i završavaju u marginalnoj lamini dorzalnih rogova kraljezničke moždine, gdje ekscitiraju neurone drugog reda neospinotalamičnog takta. Od tih neurona odlaze duga vlakna koja prednjom komisuram prelaze na suprotnu stranu kraljezničke moždine i zatim se anterolateralnim kolumnama penju prema mozgu (Slika 1). Većina vlakana neospinotalamičnog trakta odlazi neprekinuta do talamusa gdje završavaju u ventrobazalnom kompleksu. Neka vlakna završavaju na stražnjoj skupini talamičnih jezgara. Signali se iz tih talamičnih područja prenose u somatosenzoričku koru i druga bazalna područja.

Paleospinotalamični trakt prenosi bolne podražaje koji se uglavnom provode perifernim C vlaknima, no može prenositi i neke signale koji dolaze vlaknima vrste A $\delta$ . Skoro sva periferna vlakna tog puta završavaju u želatinoznoj tvari dorzalnih rogova kraljezničke moždine. Neuroni drugoga reda se združuju s vlaknima brzog puta te aksoni prvo prelaze prednjom komisuram na suprotnu stranu kraljezničke moždine, a potom se anterolateralnim putem

penju prema mozgu i prenose do talamusa, tektalnog područja mezencefalona, sivog područja oko akvedukta te retikularne jezgre produljene moždine, ponsa i mezencefalona (Guyton i Hall, 2012).



Slika 1. Prijenos bolnih signala neospinotalamičkim i paleospinotalamičkim putovima. Modificirano prema [www.frca.co.uk](http://www.frca.co.uk)

### 1.1.2. Značajni neurotransmitori u nocicepciji

Glavni ekscitacijski neurotransmitor u osjetnom putu u svim neuronima je glutamat. Djeluje ekscitacijski preko ionotropnih AMPA i NMDA receptora na perifernim okončinama aferentnih živaca, neuronima dorzalnog roga kralješnične moždine i neuronima u talamusu. Kod upalnih stanja se pojačano izlučuje iz nociceptora, ali i iz okolnih stanica zajedno sa SP i CGRP. Učinak glutamata nastupa brzo, ali djeluje i kratko, samo nekoliko milisekundi. Spora bol je vjerojatnije posredovana SP koja se luči na živčanim završecima C-vlakana (Guyton i Hall, 2012; Bach-Rojecky, 2006). U fiziološkim uvjetima glutamat se luči na periferiji, prilikom aktivacije nociceptora termalnim podražajem ili primjenom kapsaicina te preko receptora na primarnim aferentnim završecima nemijeliniziranih C-vlakana doprinosi nocicepciji (Bach-Rojecky, 2006). U dorzalnom rogu kralješnične moždine glutamat može djelovati i na presinaptičke NMDA receptore na membranama središnjih grana aferentnog senzornog vlakna, što rezultira dodatnim povećanjem lučenja neurotransmitora u središnje sinapse (Guyton i Hall, 2012). Brojni neurotransmitori su različito ko-lokalizirani u aferentnim živčanim završecima. SP i drugi tahikinini, CGRP, somatostatin, faktor lučenja kortikotropina (CRF), kolecistokinin, galanin, vazoaktivni intestinalni peptid (VIP) su od



velike važnosti u transmisiji bolnih impulsa, a luče se iz središnjih okončina aferentnog senzornog vlakna. I mnogi drugi medijatori iz ne-živčanih izvora (glija stanica) u dorzalnom rogu kralješnične moždine, poput ATP-a, NO, prostaglandina i različitih neurotropina, mogu sinergistički pojačavati ili inhibirati transmisiju (Milan MJ., 1999).

### 1.1.3. Periferna i centralna senzitivacija

Za razliku od drugih osjetnih stanica gdje dugotrajni podražaji uzrokuju prilagodbu i smanjenu podražljivost, kod dugotrajnijeg podraživanja nociceptora bol se pojačava i iz akutne prelazi u kroničnu. U tom procesu kronifikacije boli važnu ulogu imaju mehanizmi senzitivacije (Bach-Rojecky, 2006).

Razlikujemo perifernu (primarnu) i centralnu (sekundarnu) senzitivaciju, a jedna i druga mogu biti rana/brza ili kasna/odgođena. Prijelaz iz rane u kasnu senzitivaciju podudara se s prijelazom akutne boli u kroničnu. U brznoj perifernoj senzitivaciji djelovanje upalnih medijatora poput prostaglandina rezultira fosforilacijom receptora i Na<sup>+</sup> kanala na membranama nociceptora s posljedičnim smanjenim pragom podražaja. Kasna periferna senzitivacija uključuje različite mehanizme neuroplastičnosti i transkripcijske promjene, a djelomično je posredovana aktivacijom receptora za čimbenik tumorske nekroze alfa (TNF  $\alpha$ ) i NGF nakon čega dolazi do sinteze novih ionskih kanala i receptora, što doprinosi daljnjem smanjenju praga podražaja.

Središnja senzitivacija odražava povećanu podražljivost neurona drugog reda u dorzalnom rogu kralješnične moždine, a posljedica je periferne senzitivacije, odnosno povećane učestalosti i duljine trajanja akcijskih potencijala koji dolaze s periferije (Bach-Rojecky, 2006). To dovodi do povećanog otpuštanja glutamata i SP na centralnim završecima primarnih neurona, koje zatim aktiviraju NMDA receptore na sekundarnim neuronima te dolazi do porasta koncentracije unutarstaničnog kalcija i posljedične fosforilacije receptora i ionskih kanala sekundarnih neurona čime im se povećava podražljivost. U kasnoj središnjoj senzitivaciji NGF u sekundarnim neuronima potiče transkripciju brojnih gena, među kojima je i gen za ciklooksigenazu. Posljedično se povećava sinteza prostaglandina koji dodatno povećavaju osjetljivost sekundarnih neurona (Gamulin i sur., 2011).

Posljedica periferne i centralne senzitivacije su klinički fenomeni poput primarne (na mjestu ozljede) i sekundarne (izvan mjesta ozljede) hiperalgezije te alodinije.

## 1.2. Uloga glutamata u nocicepciji

Glutamat je glavni ekscitacijski neurotransmitor u mozgu sisavaca. Svoje učinke postiže aktivacijom dvije velike klase receptora: ionotropnih glutamatnih (iGluR) i metabotropnih glutamatnih receptora (mGluR) (Greget i sur., 2011).

U ionotropne glutamatne receptore ubrajaju se AMPA, NMDA i kainatni receptori, dok glutamatni metabotropni receptori pripadaju klasi proteina povezanih s G proteinima te su podijeljeni u 3 grupe. Sve više dokaza upućuje na važnost NMDA receptora u indukciji i održavanju centralne i periferne senzitivacije u bolnim stanjima. Riječ je o heterotetramernim transmembranskim proteinima sastavljenima od NR1, NR2(A, B, C, D) i NR3(A, B) podjedinica (Slika 2). Značajke pojedinih receptora ovise o vrsti podjedinica koje čine pojedini NMDA receptor, pa se tako NMDA receptori koji sadrže NR2A podjedinicu lakše otvaraju i brže deaktiviraju od NMDA receptora s NR2B podjedinicom. Omjeri mRNA za pojedine podjedinice NMDA receptora se mijenjaju kao odgovor na perifernu tkivnu ili živčanu ozljedu. Gaunitz i suradnici proveli su studiju gdje je korištena metoda RT-PCR (engl., *real time polymerase chain reaction*) kako bi otkrili utjecaj formalina primijenjenog u stražnju šapu na ekspresiju pojedinih NR podjedinica u lumbalnom dijelu kralježničke moždine štakora (Gaunitz i sur., 2002). Iako NR2A i NR2B podjedinice mogu biti fosforilirane in vitro, fosforilacija tirozina na NR2B, za razliku od NR2A, povezana je s trajnom boli nakon upale (Guo W i sur., 2002).

Receptori koji sadrže NR2B podjedinicu čine se posebno važni u nocicepciji, čime bi NR2B selektivni antagonisti mogli biti korisni lijekovi u liječenju kronične boli (Gray i sur., 2011; Petrenko i sur., 2003; Dingleline i sur., 1999; Chen i sur., 1999; Vicini sur., 1998).

Od metabotropnih glutamatnih receptora, grupa I (mGLUR1, mGLUR5) spregnuta je s aktivacijom fosfolipaze C (PLC) te posljedičnim porastom koncentracije unutarstaničnih kalcijevih iona i aktivacijom protein kinaze C (PKC). Osim toga, receptori grupe I mogu aktivirati dodatne signalne putove preko pojedinih efektora poput fosfolipaze D, kazein kinaze 1, Jun kinaze, MAPK/ERK signalnog puta i drugih, a koji imaju značajnu ulogu u sinaptičkoj plastičnosti. Grupe II i III mGluR su dominantno spregnute s  $G_{i/o}$  proteinima, te su na taj način povezani s inhibicijom adenilat ciklaze i direktno reguliraju ionske kanale i druge signalne molekule poput MAPK i PI3 kinaze (Greget i sur., 2011).

Iako NMDA receptori imaju visok afinitet za glutamat, aktiviraju se značajno sporije od AMPA i kainatnih receptora zbog izražene ovisnosti o naponu.

Glutamat oslobođen iz presinaptičkih završetaka učinkovito se uklanja iz sinaptičke pukotine presinaptičkim glutamatnim transporterima i obližnjim astrocitima. Stoga je glutamat

dostupan u sinapsi vrlo kratko tijekom sinaptičke transmisije niske frekvencije. NMDA receptori blokirani su  $Mg^{2+}$  pri potencijalu mirovanja, ali se otvore kada se aktivira dovoljan broj AMPA receptora te istovremeno vežu glicin i glutamat, čime dolazi do depolarizacije. Membranski potencijal postaje pozitivan te se uklanja blokada magnezijevim ionom. NMDA receptori kontroliraju kationski kanal koji je jako permeabilan za monovalentne ione  $Ca^{2+}$  (Fleming i England, 2004; Huang i Bergles, 2004).

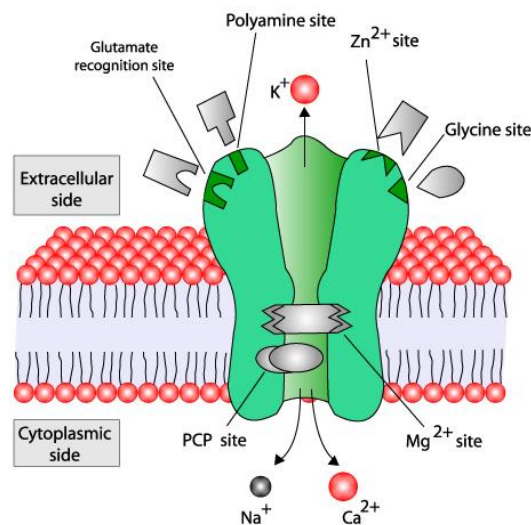
Aktivacija AMPAR je brza i prolazna i uzrokuje kratke depolarizacije koje ne traju dulje od nekoliko milisekundi. NMDA receptori nisu ključni za bazalnu sinaptičku transmisiju, već reguliraju funkcionalnu i strukturnu neuroplastičnost preko o kalciju ovisnih signalnih kaskada, čime se razlikuju od ostalih ionotropnih receptora (Blanke ML, VanDongen AMJ., 2009).

Sinaptička plastičnost označava dugoročne promjene u sinaptičkoj povezanosti i učinkovitosti, nastale zbog fizioloških promjena u neuronalnoj aktivnosti poput učenja i pamćenja ili uslijed patoloških promjena (epilepsija i dr.). Značajan i dobro proučen fenomen u sinaptičkoj plastičnosti je dugotrajna potencijacija (engl., *long term potentiation* ili LTP). LTP je produljeno (in vivo danima ili tjednima) povećanje sinaptičke transmisije koje slijedi nakon kratkotrajne jake presinaptičke stimulacije visoke frekvencije. Suprotno dugotrajnoj potencijaciji je dugotrajna depresija (eng., *long term depression*) koja nastaje nakon dulje presinaptičke stimulacije niske frekvencije (Rang i sur., 2014).

Broj NMDA receptora na perifernim živčanim vlaknima se povećava tijekom upale, što može doprinijeti perifernoj senzitivaciji u upali. Nociceptivni odgovori inducirani injekcijom glutamata u šapu miša, osim perifernih, uključuju aktivaciju spinalnih i supraspinalnih NMDA receptora, a signalizacija u središnjim sinapsama je povezana s otpuštanjem dušikova monoksida u postsinaptičkom neuronu, koji potom difundira i stimulira susjedne neurone (središnje presinaptičke završetke primarnog vlakna) te povećava otpuštanje SP, što će rezultirati hiperalgezijom i alodinijom (Petrenko i sur., 2003; Riedel i Neeck, 2001). Fosforilacija tirozinskih ostataka na podjedinicama NMDARs čini se ključna u nastajanju i održavanju hiperalgezije inducirane upalom ili ozljedom živca (Chen i sur., 2010). PKC smanjuje i blokadu NMDA receptora magnezijevim ionom. Osim toga, povećana koncentracija  $Ca^{2+}$  aktivira i dušik oksid sintazu (NOS), a oslobađanje NO olakšava otpuštanje glutamata. Aktivira se i fosfolipaza A2 te nastaje arahidonska kiselina koja pojačava presinaptičko otpuštanje glutamata. Neurotropni faktor moždanog porijekla (BDNF) oslobođen sa živčanih završetaka ima multimodalnu ulogu u ranim i kasnim stadijima LTP (Rang i sur., 2014).

Nađena je uska veza između neuropatske boli i aktivacije PKC.

Osim PKC, PKA i CaMKII, ERK (engl., *extracellular signal regulated kinase*) vjerojatno sudjeluju i doprinose ekscitacijskoj sinaptičkoj plastičnosti u SŽS-u. Aktivacija CaMKII stimulira vlastito vezanje za citoplazmatsku domenu NR2B podjedinice. CaMKII $\alpha$ , glavna izoforma CaMKII eksprimirana u mozgu, selektivno je lokalizirana u regijama koje procesiraju bol, kao što je lamina II dorzalnog roga i dorzalni gangliji kralježničke moždine (Petrenko i sur., 2003).



Slika 2. Shematski prikaz NMDA receptora. (preuzeto s: <http://www.frca.co.uk>)

NMDA receptori prisutni presinaptički dijele određene funkcije s postsinaptičkim NMDA receptorima, poput uloge u dugoročnoj sinaptičkoj plastičnosti, iako različitim mehanizmom. Moguće je da su neke funkcije za koje je prethodno smatrano da su posredovane postsinaptičkim receptorima, zapravo rezultat djelovanja presinaptičkih NMDA receptora.

Izazivaju depolarizaciju i propusni su za kalcijeve ione, čime se omogućava pojačano lučenje glutamata u sinaptičku pukotinu, no moguće je da presinaptički NMDA receptori signaliziraju i preko o naponu i kalciju neovisnim mehanizmima.

Presinaptički NMDA receptori posreduju o frekvenciji ovisno sniženje praga podražljivosti. Pobuđene ekscitacijske postsinaptičke struje su veće kada se stimulacijska frekvencija poveća sa 0,5 Hz na 3 Hz, a to povećanje je blokirano antagonistima NMDA receptora.

U neuronima korteksa presinaptički NMDA receptor koji sadrži NR2B podjedinicu posreduje slične učinke na otpuštanje glutamata. Presinaptički NMDA autoreceptori također mogu posredovati suprotne učinke poput smanjenog otpuštanja glutamata.

Na sinapsama paralelnih vlakana i Purkinjeovih stanica, aktivacija presinaptičkih NMDA receptora je rezultirala značajnim smanjenjem ekscitacijskih postsinaptičkih struja (Corlew i sur., 2008).

### 1.2.1. Antagonisti glutamatnih receptora u liječenju boli

NMDA receptori utječu na mnoge procese u razvoju sinapsi, plastičnosti i neurotransmisiji. Disfunkcija NMDA receptora je prisutna u mnogim neurološkim poremećajima poput shizofrenije, moždanog udara, epilepsije i neuropatske boli (Corlew i sur., 2008). Opioidna tolerancija i hiperalgezija inducirana opioidima su stanja koja negativno utječu na terapiju boli, a smatra se da su u njihov nastanak uključeni glutamatni receptori. Reducirana funkcija opioidnih receptora je uzrokovana smanjenjem osjetljivosti opioidnih receptora što dovodi do opioidne tolerancije, dok do hiperalgezije inducirane opioidima dolazi zbog duge primjene opioida, što rezultira paradoksalnim povećanjem atipične boli koja je nepovezana s izvornim nociceptivnim stimulusom (DuPen A i sur., 2007; Bennet GJ., 2000).

Stoga bi NMDA antagonisti mogli imati značajnu ulogu u terapiji boli. Postoji nekoliko lijekova koji se s većim ili manjim afinitetom vežu za NMDA receptore i blokiraju im funkciju. Ozbiljnost i učestalost nuspojava ovisi o afinitetu za NMDA receptor. Primjena ovih lijekova u velikoj je mjeri ograničena nuspojavama, od kojih su najčešće vidljive one na razini SŽS-a, poput: halucinacija, umora, vrtoglavice, glavobolje, noćnih mora i dr. (www.medscape.com)

Ketamin se koristi u smanjenju boli kod pacijenata koji imaju bolove uzrokovane tumorom ili neuropatijom (Jorum i sur., 2003; McQueen i Baroletti, 2002).

Uporaba ketamina u kroničnoj boli je ipak ograničena zbog već navedenih nuspojava nakon i.v. infuzije. Intratekalna (i.t.) primjena ketamina je znatno rjeđe korištena. Objavljeno je nekoliko prikaza slučaja među kojima je i.t. primijenjen S(+)- ketamin uspješno smanjio nemalignu bol tijekom 3 tjedna, te dva slučaja gdje je racemični ketamin dan i.t. smanjio malignu bol (Benrath i sur., 2005).

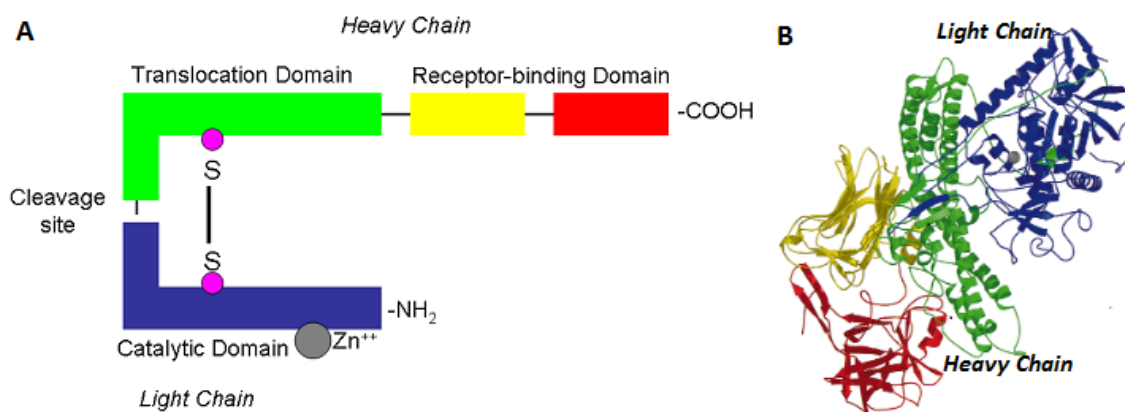
Memantin, amantadin i dekstrometorfan su slabiji NMDA antagonisti sa sigurnijim profilom toksičnosti, no nisu pokazali dovoljnu korist u neuropatskoj boli i boli rezistentnoj na opioide (www.medscape.com).

### 1.3. Botulinum toksin

Botulinum toksin je egzotoksin kojeg proizvode bakterije *Clostridium botulinum*, gram pozitivni striktni anaerobi sa supterminalnim sporama. Raširene su u prirodi, osobito u tlu. Do sada je opisano 8 serotipova toksina (A-H). U ljudi botulizam uzrokuju serotipovi A, B, E i F. Pojedinačni soj uvijek proizvodi samo jedan serotip toksina. Trovanje botulinum toksinima naziva se botulizam, a karakterizirano je mlohavom paralizom uzrokovanom interferencijom s otpuštanjem neurotransmitera acetilkolina na presinaptičkim završecima motoneurona. Procjenjuje se da je letalna doza kristaliničnog botulinum toksina tipa A (BT-A) oko 70 µg kod peroralnog unošenja, 0,09-0,15 µg intravenskom i intramuskularnom primjenom te oko 0,70-0,90 µg prilikom inhalacije, zbog čega je najpotentniji otrov otkriven do danas. U nanogramskim količinama pročišćeni toksin se klinički primjenjuje lokalno u terapiji različitih stanja koja su karakterizirana povećanom mišićnom kontrakcijom pri čemu dolazi do dugotrajne paralize mišića (Kalenić i sur., 2013; Bach-Rojecky, 2006).

#### 1.3.1. Struktura botulinum toksina tipa A

BT-A (150 kDa) sastoji se od teškog lanca (engl., *heavy chain*, HC) mase 100 kDa i lakog lanca (engl., *light chain*, LC) mase 50 kDa (Slika 3). Teški lanac se sastoji od 2 domene: N terminalne domene (H<sub>N</sub>, translokacijska domena) koja posreduje u translokaciji LC, dok se C terminalna domena veže za akceptorska mjesta na membranama neurona. BT-A je sastavni dio multimernog progenitorskog toksičnog kompleksa molekulske mase oko 900 kDa, koji se sastoji od BT-A i različitih netoksičnih proteina. Tu se ubrajaju četiri klostridijska proteina: netoksični nehemaglutininski protein (NTNHA) i tri hemaglutinina (HA-17, HA-33 i HA-70). Navedeni proteini služe u stabilizaciji BT-A kod izloženosti visokim temperaturama, niskom pH u probavnom sustavu te apsorpciji tijekom intoksikacije (Lam i sur., 2015; Gu i sur., 2013; Fujinaga i sur., 2009; Turton i sur., 2002).



Slika 3. Struktura botulinum toksina (preuzeto s: <http://www.ebi.ac.uk>)

A) Shematski prikaz BT-A

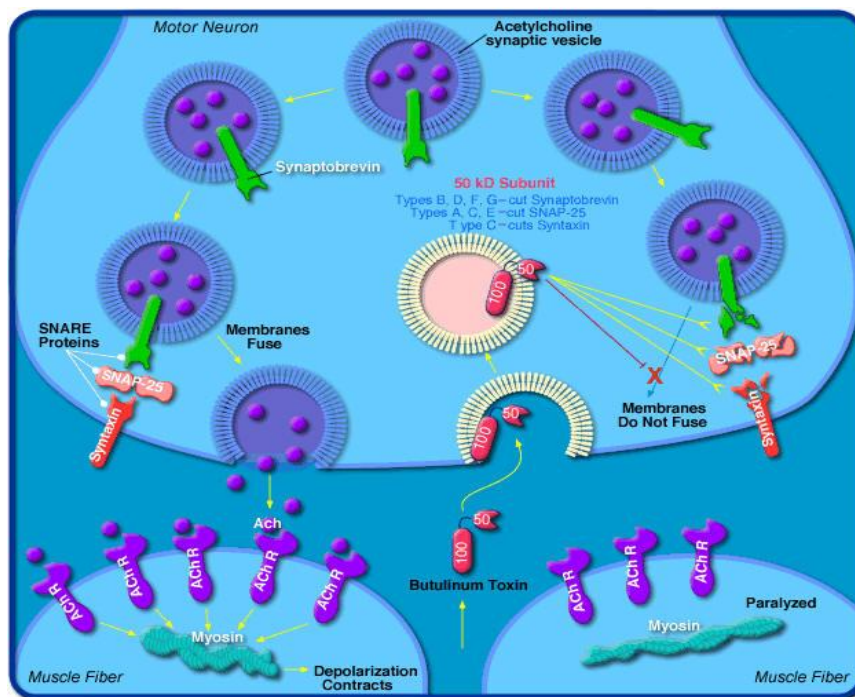
B) Kristalna struktura BT-A. Katalitička domena je obojena plavom bojom. Translokacijska domena teškog lanca je obojena zeleno, C terminalna domena koja se veže za receptor obojena je žutom i crvenom bojom.  $Zn^{2+}$  koji sudjeluje u katalizi prikazan je kao sivi krug.

### 1.3.2. Mehanizam djelovanja botulinum toksina tipa A

Dobro prihvaćen model dvostrukog receptora predlaže da se botulinum toksin, neovisno o kojem se serotipu radi, simultano veže za polisijalogangliozide na živčanim završecima i na specifične proteinske receptore u nanogramskim količinama (Slika 4). N-terminalna domena ( $H_N$ ) ulazi u interakciju s aktivnim mjestom LC, koji je o cinku ovisna metaloproteaza koja cijepa jedan ili više proteina ključnih u procesu egzocitoze neurotransmitora; SNAP-25 (*SyNaptosomal 1 Associated Protein*), sinaptobrevin i sintaksine koji se zajednički nazivaju SNARE (*Soluble N-ethylmaleimid fusion protein Attachment Protein (SNAP) Receptor*) proteinima (Kim i sur., 2015; Gu i sur., 2013; Peng i sur., 2012).

Brzina ulaska BT-A u endosom korelira s brzinom endocitoze sinaptičkih vezikula sugerirajući da BT-A efektivno iskorištava takav način ulaska u neuron.  $H_C$  i  $H_N$  su uključeni u proces vezanja toksina za membranu neurona. Jednom kada je u endosomu, kiseli pH mijenja konformaciju  $H_N$  omogućujući učinkovito umetanje alfa heliksa  $H_N$  koji formiraju transmembranske kanale uključene u translokaciju LC i uključuju dinamičko savijanje i razmatanje LC nakon prolaska kroz kanale. U tom procesu,  $H_N$  također služi kao šaperon, prevenirajući agregaciju LC u kiseloj sredini endosoma i održavanje njegove nesavijene konformacije tijekom prolaska kroz kanal, kao i ponovno savijanje u citosolu. Disulfidni most između  $H_N$  i LC u endosomu reducira NADPH tioredoksin reduktaza te se time otpušta LC u citosol. LC mijenja konformaciju i postaje aktivna o cinku ovisna metaloproteaza (Kim i sur., 2015; Kalandakanond i Coffield, 2001).

Svi serotipi inhibiraju lučenje acetilkolina iz presinaptičkih završetaka, a razlikuju se po ciljnim proteinima koje cijepaju, po potentnosti i nekim karakteristikama u djelovanju. BT-A, C i E cijepaju SNAP-25, serotipovi B, D, F i G cijepaju sinaptobrevin ili VAMP (engl., *Vesicle-Associated Membrane Protein*), dok serotip C cijepa i sintaksin 1a. Svi navedeni proteini sudjeluju u procesu neuroegzocitoze. Najdulju aktivnost na neuromuskularnoj spojnici imaju BT-A i C1 (u ljudi 4-6 mjeseci), a BT-E najkraće, kod ljudi 4-6 tjedana (Davletov i sur., 2005). Procijenjeno je da BT-A posredovano cijepanje oko 10% SNAP-25 gotovo u potpunosti uzrokuje mišićnu paralizu i to više od 90% (Kalandakanond i Coffield, 2001). Iako je do danas SNAP-25 jedina prihvaćena meta djelovanja BT-A, rezultati nekoliko in vitro studija sugerirali su da inhibicija neuroegzocitoze ne mora nužno ovisiti o cijepanju SNAP-25. Jedan od dokaza potiče iz istraživanja na staničnoj liniji PC12 gdje je BT-A spriječio egzocitozu acetilkolina induciranu arahidonskom kiselinom ili aktivacijom fosfolipaze A2, premda je ekspresija SNAP-25 prethodno prevenirana antisense oligonukleotidom (Matak i Lacković, 2014).



Slika 4. Mehanizam djelovanja botulinum toksina A (preuzeto s: [www.uwyo.edu](http://www.uwyo.edu))

*Nakon vezanja za polisijalogangliozide i proteinske receptore na membrani neurona pomoću teškog lanca( 100 kDa), dolazi do internalizacije i translokacije biološki aktivnog kratkog lanca (50 kDa) BT-A u citosol, koji cijepa SNAP-25 protein i tako sprječava egzocitozu acetilkolina i drugih neurotransmitora, poput glutamata.*



### 1.3.3. Mehanizam antinociceptivnog djelovanja botulinum toksina tipa A

Iako smanjeni mišićni tonus zbog inhibicije otpuštanja acetilkolina na živčano mišićnoj spojnici može posredno doprinijeti smanjenju boli, male doze BT-A dovoljne za smanjenje boli koja traje dulje od pridruženog neuromuskularnog učinka sugeriraju djelovanje BT-A na senzorne ili autonomne živce. To su pokazale i ranije studije u bolesnika s cervikalnom distonijom, kod kojih je smanjenje boli nastupilo prije, trajalo dulje i bilo izraženije od miorelaksirajućeg učinka BT-A. Klinička opažanja su pokazala dugotrajno smanjenje određenih vrsta boli nakon jednokratne lokalne primjene, po čemu se BT-A razlikuje od svih poznatih tvari s analgetskom djelovanjem (Bach-Rojecky, 2006).

Osim uloge u lučenju neurotransmitora, SNAP-25 modulira aktivnost  $Ca^{2+}$  kanala i vjerojatno drugih ionskih kanala ovisnih o naponu. Ciljajući SNAP-25, BT-A može prevenirati translokaciju receptora kao što su NMDA i TRPV1 receptori na neuronalnu membranu (Matak i Lacković, 2014).

Najprije se smatralo, temeljem nekoliko pretkliničkih istraživanja, da BT-A na mjestu primjene inhibira lučenje neurotransmitora i na taj način smanjuje perifernu senzitivaciju.

Cui i suradnici su pokazali da BT-A smanjuje koncentraciju glutamata u ekstracelularnoj tekućini tkiva šape nakon formalinom uzrokovane boli (Cui i sur., 2004). Slično je opaženo i u eksperimentalnim modelima boli u ljudi nakon lokalnog injiciranja kapsaicina (Bittencourt i sur., 2014). Međutim, djelovanje BT-A na smanjenje lučenja glutamata u perifernim tkivima bilo je vrlo skromno, a kasnija su istraživanja pokazala da je u mehanizam antinociceptivnog djelovanja BT-A uključen njegov aksonalni transport s periferije i inhibicija lučenja neurotransmitora u sinapsama dorzalnog roga kralješničke moždine (Bach-Rojecky, 2006).

Točan mehanizam modulacije centralne senzitivacije s BT-A nije u potpunosti razjašnjen, međutim, istraživanja u kojima su korišteni antagonisti neurotransmitorskih receptora ukazali su na GABA i opioidnu transmisiju kao glavne elemente antinociceptivnog učinka BT-A (Bardoni i sur., 2013). Pokazano je da BT-A djeluje na GABA i opioidnu transmisiju na razini kralješničke moždine, ali ne i supraspinalno (Drinovac i sur., 2014).

BT-A ne mijenja fiziološki prag bolnog podražaja ili akutnu nociceptivnu bol (Matak i Lacković, 2014).

#### 1.4. Klinička primjena botulinum toksina

Danas se terapijski koriste samo dva serotipa botulinum toksina, tip A i tip B.

Potentnost im se izražava u internacionalnim jedinicama (i.j.), a jedna jedinica odgovara količini toksina koja nakon intraperitonealne primjene prouzroči smrt 50% miševa (1 i.j. Botox<sup>®</sup>-a odgovara 0,048 ng BT-A).

BT-A i BT-B se razlikuju u potentnosti, trajanju djelovanja, učestalosti nuspojava i antigenosti. Djelovanje BT-B nastupa brže i traje kraće u odnosu na BT-A, a praćeno je i s više nuspojava od BT-A. 1989. godine Američke agencija za hranu i lijekove (engl. FDA - *Food and Drug Administration*) odobrila je terapijsku primjenu BT-A prvotno za liječenje strabizma, a zatim u terapiji blefarospazma i hemifacijalnog spazma.

2000. godine BT-A odobren je u liječenju cervikalne distonije, dječje cerebralne paralize i etiološki različitih spasticiteta mišića, dok je 2002. godine odobren u kozmetičke svrhe za smanjenje bora (Bach Rojecky, 2006).

Danas je primjena BT-A odobrena za poremećaje autonomnog živčanog sustava, i to za primarnu aksilarnu hiperhidrozu (Naumann i sur., 2002), te za prevenciju određenih tipova migrena (Durham i sur., 2011; Aurora i sur., 2010).

Primjena BT-A izvan odobrenih indikacija (*off-label*) je česta u kliničkoj praksi zbog njegovih jedinstvenih farmakoloških karakteristika te se tako koristi u nizu poremećaja uzrokovanih disfunkcijom autonomnog živčanog sustava te za različita kronična bolna stanja (Chen i Sheng, 2012; Atassi, 2004; Goschel i sur., 1997).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Brojna istraživanja pokazuju da primjena botulinum toksina smanjuje lučenje glutamata iz perifernih završetaka primarnih aferentnih neurona (Da Silva i sur., 2014; Cui i sur., 2004). Klinička opažanja ukazuju na dugotrajano (višemjesečno) smanjenje boli nakon jednokratne lokalne primjene malih doza BT-A. Analgetik takvih svojstava bi za farmakoterapiju boli mogao biti od posebne važnosti (Bach Rojecky, 2006).

Budući da je u in vivo pokusima na modelu upalne boli u štakora izmjereno smanjenje lučenja glutamata iz perifernih okončina aferentnih živaca (Cui i sur., 2004), pretpostavljeno je da BT-A ulazi u senzorne neurone gdje cijepa SNAP-25 protein i na taj način ometa neuroegzocitozu iz perifernih okončina. Međutim, kasnija istraživanja su sugerirala da BT-A ne djeluje samo periferno, već da u dorzalnom rogu kralješničke moždine inhibira lučenje neurotransmitora. Budući da je glutamat najvažniji ekscitacijski neurotransmitor u nociceptivnom putu, logična je pretpostavka da BT-A inhibira lučenje glutamata u središnjim sinapsama, što bi djelomično objasnilo središnji mehanizam njegovog antinociceptivnog djelovanja. Budući da je u kliničkoj praksi sistemska primjena antagonista glutamatnih receptora, poput ketamina i memantina ograničena brojnim nuspojavama u primijenjenim analgetskim dozama, cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati mogući sinergistički učinak BT-A i niskih doza antagonista NMDA receptora.

Za istraživanja u ovom diplomskom radu odabran je kompetitivni NMDA antagonist 2-amino-5-fosfonopentanoična kiselina (AP5), koji se u ranijim istraživanjima pokazao najpotentnijim NMDA antagonistom u formalinskom testu kao eksperimentalnom modelu boli u odnosu na druge NMDA antagoniste: MK801, memantin, dekstrorfan, dekstrometorfan i ketamin (Chaplan i sur., 1997).

Hipoteza ovog istraživanja je da BT-A povećava analgetski učinak niskih doza antagonista glutamata. Ukoliko bi se to potvrdilo, otvorilo bi se novo područje istraživanja interakcija botulinum toksina i središnjeg glutamatnog sustava, a dobiveni rezultati mogli bi utjecati na liječenje kronične boli u kliničkoj praksi.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Životinje

Mužjaci štakora soja Wistar uzgajani su na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, gdje su provedeni testovi praćenja bolnog ponašanja, kako je opisano u nastavku. U pokusima na laboratorijskim životinjama poštivan je Zakon o zaštiti životinja (NN 125/13) te smjernice Međunarodne udruge za proučavanje boli (International Association for Study of Pain, IASP), kao i direktivu Europske unije za rad na laboratorijskim životinjama(2010/63/EU). Za obavljanje istraživanja dobivena je dozvola Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (br. 72.3-13, HR 191/02/P), a sve pokuse su izvodile osobe s dozvolom za rad s pokusnim životinjama.

#### 3.2. Ispitivane tvari: BT-A i AP5

U pokusima je korišten BT-A (Botox<sup>®</sup>, Allergan, SAD). Bočica komercijalnog pripravka Botoxa<sup>®</sup> sadrži 100 internacionalnih jedinica (i.j.) pročišćenog BT-A u obliku liofilizata. Jedna internacionalna jedinica odgovara količini toksina koja nakon i.p.<sup>1</sup> primjene uzrokuje smrt 50% miševa ( $LD_{50} = 0,048 \text{ ng} = 1 \text{ i.j.}$ ). BT-A je primijenjen u dozi od 5 i.j./kg i volumenu od 20  $\mu\text{L}$  supkutano u plantarnu površinu stražnje desne šape (intraplantarno, i.pl.) neanesteziranim životinjama. Selektivni NMDA antagonist AP5 (Tocris Bioscience, Bristol, Velika Britanija) je primijenjen intratekalno (i.t.) u dozama od 1, 5 i 10  $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ , budući da doze veće od 10  $\mu\text{g}$  mogu utjecati na motoričku funkciju. (Chaplan i sur., 1996). BT-A i AP5 otopljeni su u fiziološkoj otopini (0.9% NaCl), a primijenjeni su pomoću inzulinskih šprica s integriranim iglama promjera 27½ G i volumena 0,5 mL (Terumo, Leuven, Belgija).

#### 3.3. Eksperimentalni model boli: formalinski test

50  $\mu\text{L}$  5%-tnog formalina, dobivenog iz 35 %-tnog razrjeđivanjem s vodom u omjeru 1:7, injicirano je supkutano u plantarnu površinu stražnje desne šape štakora. Broj trzaja i lizanja tretirane šape, kao pokazatelj bolnog ponašanja životinje, praćen je u razdoblju od 60 min. Injiciranje formalina u šapu štakora (s.c.) uzrokuje reproducibilan dvo-fazični odgovor.

Prva je faza (0-15 min) posljedica izravnog podražaja nociceptora formalinom. Druga faza (15-60 min) je posljedica djelovanja oslobođenih upalnih medijatora, a pretpostavlja se i periferne, te središnje senzitivacije (Bach Rojecky, 2006).

### 3.4. Eksperimentalni protokol

BT-A je primijenjen 5 dana prije, a AP5 15 min prije izvođenja formalinskog testa. Doza i vrijeme primjene BT-A prije izvođenja formalinskog testa izabrani su prema prijašnjim pokusima (Bach-Rojecky i sur., Bach-Rojecky i Lackovic, 2005), dok su doza i vrijeme primjene AP5 izabrani prema pokusu Chaplana i suradnika (1996). Kontrolne su životinje umjesto ispitivanih tvari injicirane odgovarajućim volumenima fiziološke otopine. Za i.t. primjenu načinjen je mali rez (1 cm) na koži lumbalnog L3-L5 dijela kralješnične moždine te je 10  $\mu$ L AP5 ili fiziološke otopine injicirano između spinoznih nastavaka kralješaka u spinalni kanal. Ispravnost primjene osigurana je promatranjem pojave pomaka repa životinje prilikom injiciranja. Tijekom i.t. primjene životinje su bile kratkotrajno anestetizirane izofluranom (5% indukcija, a 2,5% za održavanje anestezije). Buđenje iz anestezije je trajalo do 5 min. Mjerenja su izvođena između 9 i 14 h u tihom laboratoriju te u transparentnim kavezima, u kojima su se životinje prethodno prilagođavale na uvjete mjerenja tijekom 30 min. U tablici 1 su prikazane eksperimentalne skupine životinja u pokusu.

Tablica 1. Eksperimentalne skupine i vrijeme injiciranja ispitivanih tvari

Eksperimentalna skupina	D (-5)	D (0; -15 min)
Kontrola	f.o.	f.o.
BT-A	BT-A	f.o.
AP5-1	f.o.	AP5 u dozi 1 $\mu$ g/ 10 $\mu$ L
AP5-5	f.o.	AP5 u dozi 5 $\mu$ g/ 10 $\mu$ L
AP5-10	f.o.	AP5 u dozi 10 $\mu$ g/ 10 $\mu$ L
BT-A+AP5-1	BT-A	AP5 u dozi 1 $\mu$ g/ 10 $\mu$ L
BT-A+AP5-5	BT-A	AP5 u dozi 5 $\mu$ g/ 10 $\mu$ L
BT-A+AP5-10	BT-A	AP5 u dozi 10 $\mu$ g/ 10 $\mu$ L

*D (-5) označava vrijeme intraplantarne primjene BT-A ili fiziološke otopine (f.o.) 5 dana prije formalinskog testa. D (0; -15 min) označava intratekalnu primjenu fiziološke otopine ili AP5 u odgovarajućim koncentracijama 15 minuta prije početka izvođenja formalinskog testa*

### 3.5. Statistička obrada rezultata

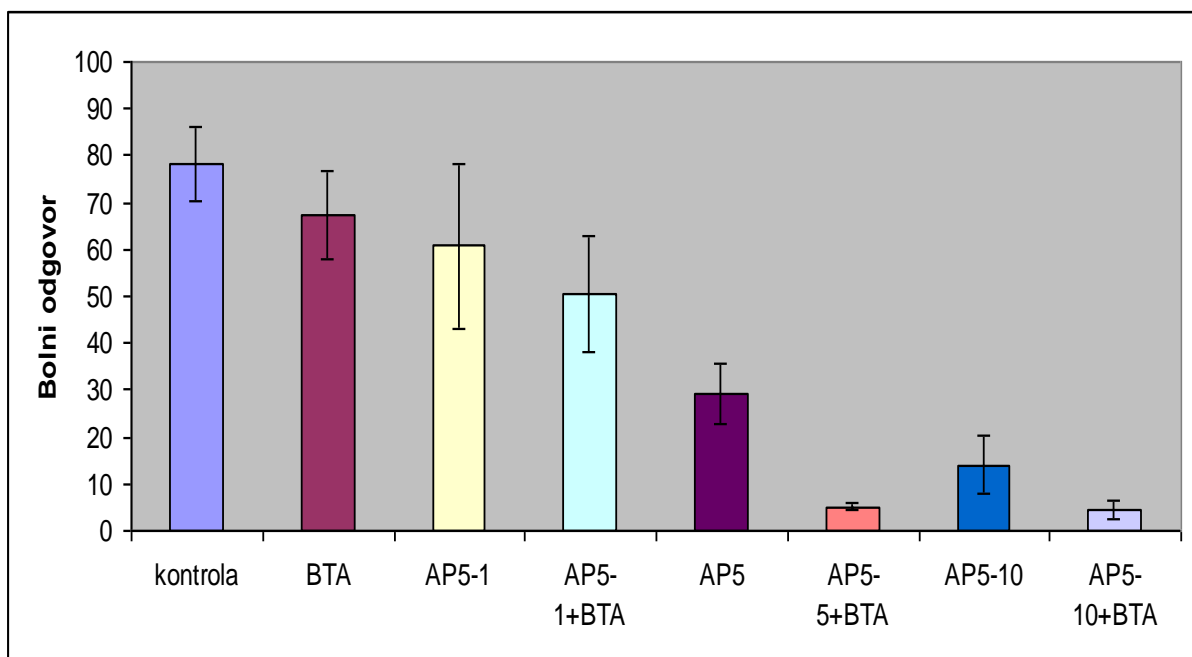
Rezultati pokusa izraženi su kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna pogreška i prikazani u obliku grafa sa stupcima. Statistička obrada podataka napravljena je pomoću testova dostupnih na mrežnoj stranici VassarStats. Nakon analize varijance (One-way ANOVA), razlike između skupina analizirane su Tukey *post hoc* testom. Značajne su sve  $p$  vrijednosti manje od 0,05 ( $p < 0,05$ ). Uspoređivane su po 4 skupine u jednoj analizi: kontrola, BT-A, AP5-1/AP5-5/AP5-10 i BT-A+AP5-1/ AP5-5/AP5-10.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

BT-A u dozi 5 i.j./kg, primijenjen periferno u šapu štakora, sukladno dosadašnjim istraživanjima nije utjecao na bolne odgovore u prvoj fazi formalinskog testa za koju se smatra da je posljedica izravne stimulacije nociceptora formalinom te predstavlja akutnu nociceptivnu bol (Bach Rojceky i sur., 2005; Cui i sur., 2004).

Antagonist NMDA receptora nakon intratekalne primjene je suprotno tome uzrokovao o dozi-ovisno smanjenje boli u prvoj akutnoj fazi testa (Slika 5, Tablica 2).

Skupine životinja koje su prije primjene AP5 pred-tretirane s BT-A pokazale su značajno manje bolnih odgovora nakon stimulacije formalinom, iz čega se može zaključiti da BT-A i AP5 djeluju sinergistički na smanjenje boli u akutnoj fazi testa.



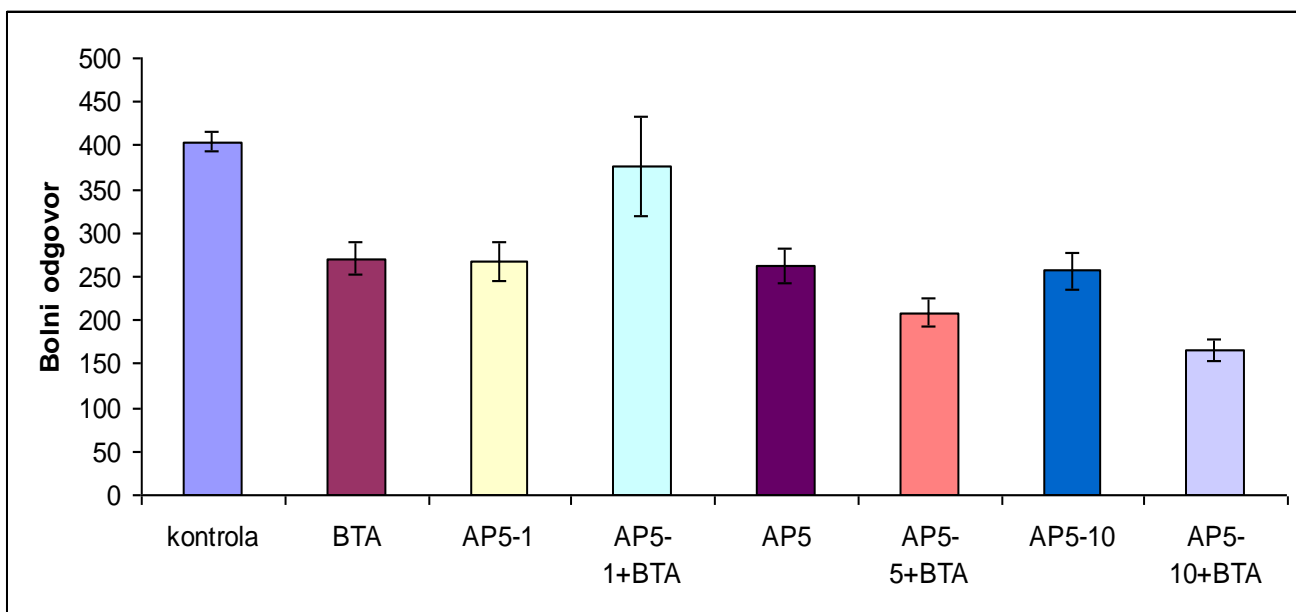
Slika 5. Bolni odgovor u 1. fazi formalinskog testa (0-15 minuta).

*Bolni odgovor je zbroj trzaja te lizanja šape. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  SEM,  $n=5-6$ . U svim skupinama sam BT-A nije smanjio bol u odnosu na kontrolu, kao što je i očekivano. AP5 je u svim skupinama smanjio bol u odnosu na kontrolu  $p<0,01$ ; Kombinacije BT-A i AP5 su u svim skupinama smanjili bol u odnosu na sam BT-A  $p<0,01$ ; kao i u odnosu na kontrolu  $p<0,01$ ; AP5 je smanjio bol u odnosu na BT-A  $p<0,01$ .*

*Tablica 2. Razlike u izmjerenim vrijednostima u bolnim odgovorima u 1. fazi formalinskog testa. Prikazane su p-vrijednosti za uspoređivane grupe životinja (ns – nije značajno)*

Skupina	AP5-1 (1 $\mu$ g/10 $\mu$ l)	AP5-5 (5 $\mu$ g/10 $\mu$ l)	AP5-10 (10 $\mu$ g/10 $\mu$ l)
kontrola vs.BT-A	ns	ns	ns
kontrola vs.AP5	<0,01	<0,01	<0,01
kontrola vs.AP5+BT-A	<0,01	<0,01	<0,01
BT-A vs.AP5	<0,01	<0,01	<0,01
BT-A vs.AP5+BT-A	<0,01	<0,01	<0,01
AP5 vs.AP5+BT-A	ns	ns	ns

Drugu fazu formalinskog testa karakterizira upalna bol koja je posljedica periferne senzitivacije nociceptora i bolnog odgovora koji traje oko 60 minuta. Formalin, nakon početne izravne stimulacije nociceptora uzrokuje odgođenu upalu karakteriziranu povećanim lučenjem upalnih i pro-nociceptivnih medijatora koji povećavaju osjetljivost perifernih nociceptora i doprinose razvoju upalne komponente boli.



Slika 6. Bolni odgovor u 2. fazi formalinskog testa (15-60 minuta)

Bolni odgovor je zbroj trzanja, lizanja šape. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  SEM,  $n=5-6$ . U svim skupinama sam BT-A smanjio je bol u odnosu na kontrolu, kao što je i očekivano. BT-A nije statistički značajno smanjio bol u odnosu na sam AP5 u svim trima primijenjenim dozama AP5. AP5 je osim u skupini AP5-1+BT-A, u svim ostalim skupinama smanjio bol u odnosu na kontrolu. BT-A+ AP5-10 su smanjili bol u odnosu na: BT-A  $p<0,01$ ; u odnosu na AP5-10  $p<0,01$ ; kao i u odnosu na kontrolu  $p<0,01$ .

Tablica 3. Razlike u izmjerenim vrijednostima u bolnim odgovorima u 2. fazi formalinskog testa. Prikazane su p-vrijednosti za uspoređivane grupe životinja (ns – nije značajno)

Skupina	AP5-1 (1 $\mu$ g/10 $\mu$ l)	AP5-5 (5 $\mu$ g/10 $\mu$ l)	AP5-10 (10 $\mu$ g/10 $\mu$ l)
kontrola vs.BT-A	<0,05	<0,01	<0,01
kontrola vs.AP5	<0,05	<0,01	<0,01
kontrola vs.AP5+BT-A	ns	<0,01	<0,01
BT-A vs.AP5	ns	ns	ns
BT-A vs.AP5+BT-A	ns	ns	<0,01
AP5 vs.AP5+BT-A	ns	ns	<0,01



Premda se u 2. fazi testa kod primjene kombinacija BT-A i antagonista NMDA receptora u dvije više doze (5 i 10 µg) postiže izraženiji učinak na smanjenje bolnih odgovora u odnosu na svaku supstancu pojedinačno, značajan sinergizam se postiže jedino kod najviše doze AP5 od 10 µg (Slika 6, Tablica 3). Neočekivano, kod najniže doze AP5 od 1 µg izmjereno je povećanje broja bolnih odgovora u odnosu na svaku supstancu pojedinačno, što se može objasniti malim brojem životinja u skupini te velikim rasapom rezultata (izmjerene vrijednosti u 2. fazi testa kretale su se od 232 do 527 bolnih odgovora u 45 minuta).

Za razliku od klasičnih analgetika, BT-A u dosadašnjim istraživanjima nije pokazao učinak ovisan o dozi, tj. nije pokazana korelacija između periferno primijenjene doze (3,5-7 i.j./kg) i opaženog antinociceptivnog učinka niti u jednom korištenom modelu boli (Bach-Rojecky i sur., 2010; Bach-Rojecky, 2006). U ispitivanjima antinociceptivnog djelovanja nisu korištene doze više od 7 i.j./kg kako ne bi došlo do motoričkog deficita koji bi mogao utjecati na mjerenje bolnih odgovora. Rezultati ovisnosti učinka o primijenjenoj dozi BT-A u kliničkoj praksi su oprečni: dok neke studije pokazuju učinak BT-A ovisan o dozi, druge to ne uspijevaju jednoznačno potvrditi. Mogući razlozi takvih kontradiktornih podataka su u različitim dozama, načinima i mjestima primjene BT-A, te načinu vrednovanja boli kod ljudi. Prijašnjim je pokusima pokazano da je lučenje glutamata izraženo u prvih 20 minuta formalinskog testa (Chaplan i sur., 1997). Temeljem toga bilo je za očekivati da će u ovom ispitivanju učinak NMDA antagonista biti najizraženiji u prvoj fazi formalinskog testa. U ranijim studijama također je pokazano da AP5 nakon intratekalne primjene u dozama višim od 10 µg uzrokuje motorne deficite koji onemogućuju objektivno mjerenje bolnih odgovora, što je odredilo odabir doza AP5 u ovom ispitivanju (1-10 µg).

Pokazali smo da u obje faze formalinskog testa kompetitivni antagonist NMDA receptora uzrokuje značajan antinociceptivni odgovor u odnosu na kontrolu.

Za razliku od toga, BT-A djeluje samo u drugoj fazi formalinskog testa, dok pojačava djelovanje AP5 u obje faze. Izostanak djelovanja BT-A na akutnu bol, odnosno njegova učinkovitost u stanjima povećane osjetljivosti (patološke boli kakva je u 2. fazi formalinskog testa) pokazana je u ranijim istraživanjima (Bach-Rojecky, 2006) te je pretpostavljeno da BT-A interferira s procesima periferne i središnje senzitivacije ulazeći u interakcije s neurotransmitskim sustavima uključenim u modeliranje nocicepcije, pri čemu je glutamatni sustav od najveće važnosti.

Premda nisu bile vidljive promjene u motorici životinja tretiranih kombinacijom BT-A i AP5, motoričku funkciju trebalo bi preciznije ispitati testovima poput refleksa uspravljanja, rotarod

testom, testom s paralelnim šipkama i sl., kako bi se isključila interferencija mogućeg motornog deficita s rezultatima mjerenja bolnih odgovora i tako izbjegli lažno pozitivni rezultati.

Istraživanje prikazano u ovom diplomskom radu prvo je koje ispituje moguću interakciju BT-A s glutamatnim sustavom čime se otvaraju nova područja istraživanja koja bi mogla odgovoriti na pitanja o još uvijek nejasnom mehanizmu antinociceptivnog djelovanja BT-A. Mogući sinergizam bi trebalo ispitati i na drugim eksperimentalnim modelima koristeći različite antagoniste glutamatnih receptora.

Jedna od mogućih pretpostavki je da BT-A cijepajući SNAP-25 posredno povećava antinociceptivnu aktivnost AP5 prevenirajući SNAP-25 ovisnu egzocitozu glutamata u središnjim sinapsama te prevenirajući translokaciju NMDA receptora na neuronalnu membranu (Matak i Lacković, 2014).

S druge strane, klinički značaj ovih rezultata je potencijalno vrlo važan budući da je liječenje kronične boli nedovoljno učinkovito te ograničeno brojnim problemima vezanim uz nuspojave postojećih analgetika.

Primjer supstanci s potencijalno vrlo jakim analgetskim djelovanjem, ali čija je primjena ograničena brojnim i teškim nuspojavama su upravo one s antagonističkim djelovanjem na glutamatni sustav. Potencijalni sinergizam između BT-A i niskih, ali sigurnih doza NMDA antagonista za kliničku bi praksu bio od iznimne važnosti.

## 5. ZAKLJUČCI

Ovim diplomskim radom:

1. potvrđeni su nalazi da BT-A ne djeluje na akutnu nociceptivnu bol, već da se njegovom perifernom primjenom u štakora uklanja upalna bol u 2. fazi formalinskog testa;
2. intratekalnom primjenom AP5, kompetitivnog antagonista glutamatnih NMDA receptora, značajno je smanjen bolni odgovor uzrokovan formalinom u akutnoj i odgođenoj upalnoj fazi testa;
3. kombinacijom BT-A u dozi 5 i.j./kg i AP5 postignut je sinergistički učinak u smanjenju boli.

Istraživanje prikazano u ovom diplomskom radu ukazalo je na interakciju između BT-A i glutamatnog sustava u procesu nocicepcije čime se otvara novo područje istraživanja koje bi moglo ponuditi odgovore na pitanja o još uvijek nejasnom mehanizmu antinociceptivnog djelovanja BT-A.

S druge strane, ovi rezultati za kliničku praksu mogu biti potencijalno zanimljivi budući da je liječenje kronične boli nedovoljno učinkovito te ograničeno brojnim problemima vezanim uz nuspojave postojećih analgetika. Potencijalni sinergizam između BT-A i niskih, ali sigurnih doza NMDA antagonista mogao bi utjecati na dizajniranje kliničkih studija kako bi se ispitala djelotvornost i sigurnost ovakvih kombinacija.

## 6. LITERATURA

Andrei B. Petrenko i sur. The Role of N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Receptors in Pain: A Review. *Anesth Analg*, 2003, 97, 1108–16.

Apostolidis A, Dasgupta P, Fowler CJ. Proposed mechanism for the efficacy of injected botulinum toxin in the treatment of human detrusor overactivity. *Eur Urol*, 2006, 49, 644-50.

Atassi M.Z. Basic immunological aspects of botulinum toxin therapy. *Mov Disord* 2004, 19, S68–S84.

Aurora SK, Dodick DW, Turkel CC, et al. Onabotulinumtoxina for treatment of chronic migraine: results from the double-blind, randomized, placebo-controlled phase of the preempt 1 trial. *Cephalalgia* 2010, 30, 793–803.

Bach-Rojecky L, Dominis M, Lacković Z. Lack of anti-inflammatory effect of botulinum toxin type A in experimental models of inflammation. *Fundam Clin Pharmacol*, 2008, 22, 503-509.

Bach-Rojecky L, Lacković Z. Central origin of the antinociceptive action of botulinum toxin type A. *Pharmacol Biochem Behav*, 2009, 94, 234-238.

Bach-Rojecky L. Antinociceptivno djelovanje botulinum toksina tipa A. Doktorska disertacija, Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, 2006

Bacterial infections in animal disease-paradigmatic examples, <https://www.uwyo.edu>, pristupljeno 15.2.2017.

Bardoni R., Takazawa T., Tong C.K., Choudhury P., Scherrer G., Macdermott A.B. Pre- and postsynaptic inhibitory control in the spinal cord dorsal horn. *Ann N Y Acad Sci*, 2013, 1279, 90–96.

Benedetto AV. The cosmetic uses of botulinum toxin type A. *Int J Dermatol*, 1999, 38, 641-655.

Bennett GJ. Update on the neurophysiology of pain transmission and modulation: focus on the NMDA-receptor. *J Pain Symptom Manage*, 2000, 19, S2-S6.

Benrath J, Scharbert G, Gustorff B, Adams HA, Kress HG. Long-term intrathecal S(+)-ketamine in a patient with cancer-related neuropathic pain. *Br J Anaesth*, 2005, 95 (2) 247-249.

Bittencourt da Silva L, Karshenas A, Bach FW, Rasmussen S, Arendt-Nielsen L, Gazerani P. Blockade of glutamate release by botulinum neurotoxin type A in humans: A dermal microdialysis study. *Pain Res Manag*, 2014, 19, 126–132.

Blanke ML, Duguid IC., Jane DE, Monaghan DT, Smart TG, Van Dongen AMJ. Biology of the NMDA Receptor. Boca Raton (FL), CRC Press/Taylor & Francis, 2009, str. 257-328.

Botulinum toxin structure, <http://www.ebi.ac.uk/biomodels-main>, pristupljeno 15.2.2017.

Camargo CH, Cattai L, Teive HA. Pain Relief in Cervical Dystonia with Botulinum Toxin Treatment. *Toxins*, 2015, 76, 2321–2335.

Chaplan SR, Malmberg AB, Yaksh TL. Efficacy of Spinal NMDA Receptor Antagonism in Formalin Hyperalgesia and Nerve Injury Evoked Allodynia in the Rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997, 280, 829-838.

Chen N, Luo T, Raymond L. A. Subtype-dependence of NMDA receptor channel open probability. *J Neurosci*, 1999, 19, 6844–6854.

Chen S. Clinical Uses of Botulinum Neurotoxins: Current Indications, Limitations and Future Developments. *Toxins*, 2012, 4, 913–939.

Corlew R, Brasier DJ, Feldman DE, Philpot BD. Presynaptic NMDA Receptors: Newly Appreciated Roles in Cortical Synaptic Function and Plasticity. *Neuroscientist*, 2008, 14, 609–625.

Cui M, Khanijou S, Rubino J, Aoki KR. Subcutaneous administration of botulinum toxin type A reduces formalin-induced pain. *Pain*, 2004, 107, 125-33.

Da Silva, Bittencourt L et al. Blockade of Glutamate Release by Botulinum Neurotoxin Type A in Humans: A Dermal Microdialysis Study. *Pain Res Manag*, 2014, 19, 126–132.

Davletov K, Bajohrs M, Binz T. Beyond BOTOX: advantages and limitations of individual botulinum neurotoxins. *Trends Neurosci*, 2005, 28, 446-52.

Drinovac V, Bach-Rojecky L, Babic A, Lackovic Z. Antinociceptive effect of botulinum toxin type A on experimental abdominal pain. *Eur J Pharmacol*, 2014, 745, 190–195.

DuPen A, Shen D, Ersek M. Mechanisms of opioid-induced tolerance and hyperalgesia. *Pain Manag Nursing*, 2007, 8, 113–121.

Durham PL, Cady R. Insights into the mechanism of onabotulinumtoxin A in chronic migraine. *Headache*, 2011, 51, 1573–7.

Flanders M, Tischler A, Wise J i sur. Injection of type A botulinum toxin into extraocular muscles for correction of strabismus. *Can J Ophthalmol*, 1987, 22, 212–217.

Fleming, England M. AMPA receptors and synaptic plasticity: a chemist's perspective. *Nature Chem Biol*, 2010, 6, 89-97.

Fujinaga Y, Matsumura T, Jin Y, Takegahara Y, Sugawara Y. A novel function of botulinum toxin-associated proteins: HA proteins disrupt intestinal epithelial barrier to increase toxin absorption. *Toxicon*, 2009, 54, 583–586.

Gamulin S. i sur. Patofiziologija, sedmo izdanje. Zagreb, Medicinska naklada, 2011, str.453-460.

Gaunitz C, Schuttler A, Gillen C, Allgaier C. Formalin-induced changes of NMDA receptor subunit expression in the spinal cord of the rat. *Amino Acids*, 2002, 23, 177–82.

Goschel H, Wohlfarth K, Frevert J, Dengler R, Bigalke H. Botulinum A toxin therapy: neutralizing and nonneutralizing antibodies-therapeutic consequences. *Exp Neurol*, 1997, 147, 96–102.

Gray JA, Shi Y, Usui H, Doring M J, Sakimura K, Nicoll R A. Distinct modes of AMPA receptor suppression at developing synapses by GluN2A and GluN2B: single-cell NMDA receptor subunit deletion *in vivo*. *Neuron*, 2011 ,71, 1085–1101.

Greget R, Pernot F, Bouteiller JMC, Ghaderi V, Allam S, Keller AF i sur. Simulation of postsynaptic glutamate receptors reveals critical features of glutamatergic transmission. *PLoS ONE*, 2011, 6, 1-18.

Gu S, Jin R. Assembly and function of the botulinum neurotoxin progenitor complex. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2013, 364, 21–44.

Guo W, Zou S, Guan Y, i sur. Tyrosine phosphorylation of the NR2B subunit of the NMDA receptor in the spinal cord during the development and maintenance of inflammatory hyperalgesia. *J Neurosci*, 2002, 22, 6208–6217.

Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2012, str.583-587.

Huang YH, Bergles DE. Glutamate transporters bring competition to the synapse. *Curr Opin Neurobiol*, 2004, 14, 346.

Jorum E, Warncke T, Stubhaug A. Cold allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: the effect of N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor antagonist ketamine—a double-blind, cross-over comparison with alfentanil and placebo. *Pain*, 2003, 101, 229-235.

Kalandakanond S, Coffield JA. Cleavage of SNAP-25 by botulinum toxin type A requires receptor-mediated endocytosis, pH-dependent translocation, and zinc. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 296, 980–986.

Kalenić S i suradnici. Medicinska mikrobiologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2013, 257.

Kim Dong-Wan, Sun-Kyung L, Joohong Ahnn. Botulinum Toxin as a Pain Killer: Players and Actions in Antinociception. Ed. Bahman Jabbari. *Toxins*, 2015, 7.7, 2435–2453.

Kowal L, Wong E, Yahalom C. Botulinum toxin in the treatment of strabismus. A review of its use and effects. *Disabil Rehabil*, 2007, 29, 1823–1831.

Lam TI, Stanker LH, Lee K, Jin R, Cheng LW. Translocation of botulinum neurotoxin serotype A and associated proteins across the intestinal epithelia. *Cell Microbiol*, 2015, 17, 1133-1143.

Marsh WA, Monroe DM, Brin MF, Gallagher CJ. Systematic review and meta-analysis of the duration of clinical effect of onabotulinumtoxinA in cervical dystonia. *BMC Neurology*, 2014, 14, 91.

Matak I, Lacković Z. Botulinum toxin A, brain and pain. *Prog Neurobiol*, 2014, 17, 39-59.



McQueen AL, Baroletti SA. Adjuvant ketamine analgesia for the management of cancer pain. *Ann Pharmacother*, 2003, 37, 1346.

Milan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*, 1999, 57, 1-164.

Naumann MK, Lowe NJ. Effect of botulinum toxin type A on quality of life measures in patients with excessive axillary sweating: a randomized controlled trial. *Br J Dermatol*, 2002, 147, 1218–1226.

NMDA receptor, <http://www.frca.co.uk>, pristupljeno 27.2.2017.

Pain pathways, <http://www.frca.co.uk>, pristupljeno 3.2.2017.

Peng Chen Z, Morris JG, Rodriguez RL, Shukla AW, Tapia-Nunez J, Okun MS. Emerging opportunities for serotypes of botulinum neurotoxins. *Toxins Basel*, 2012, 4, 1196–1222.

Rang HP, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Rang and Dale's Pharmacology, 7. izdanje. London, Elsevier Churchill Livingstone, 2014, str.459-460.

Riedel W, Neeck G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. *Z Rheumatol.*, 2001, 60, 404-15.

Rowe FJ, Noonan CP Botulinum toxin for the treatment of strabismus. *Cochrane Database Syst Rev*, 2011, doi: 10.1002/14651858.CD006499.pub3. pristupljeno: 25.2.2017.

The Emerging Role of NMDA Antagonists in Pain Management, <http://www.medscape.com>, pristupljeno: 8.3.2017.

Turton K, Chaddock JA, Acharya KR. Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. *Trends Biochem Sci*, 2002, 27, 552-8.

Vacca V, Marinelli S, Eleuteri C, Luvisetto S, Pavone F. Botulinum neurotoxin A enhances the analgesic effects on inflammatory pain and antagonizes tolerance induced by morphine in mice. *Brain Behav Immun*, 2012, 26, 489-499.

Vicini S, Wang JF, Li JH, Zhu WJ, Wang YH, Luo JH i sur. Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *J Neurophysiol*, 1998, 79, 555–566.

Wang A, Jankovic J. Hemifacial spasm: clinical correlates and treatments. *Muscle Nerve* 1998, 21, 1740–7.

Wenling C, Zhang G, Marvizón JCG. NMDA Receptors in Primary Afferents Require Phosphorylation by Src Family Kinases to Induce Substance P Release in the Rat Spinal Cord. *Neuroscience*, 2010,166, 924–934.

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

Kliničke studije pokazuju da jednokratno lokalno primijenjen BT-A smanjuje bol tijekom nekoliko mjeseci. Nadalje, brojna eksperimentalna istraživanja ukazuju da primjena botulinum toksina smanjuje lučenje glutamata iz perifernih završetaka primarnih aferentnih neurona. Budući da je glutamat najvažniji ekscitacijski neurotransmitor u nociceptivnom putu, moguće je da BT-A inhibira lučenje glutamata i u središnjim sinapsama.

Hipoteza ovog istraživanja je da BT-A povećava analgetski učinak niskih doza antagonista glutamata interakcijom na razini kralješničke moždine.

Ispitivanja su provedena na mužjacima štakora soja Wistar. BT-A (5 i.j./kg) je primijenjen intraplanarno, a kompetitivni antagonist NMDA receptora 2-amino-5-fosfonopentanoična kiselina (AP5 u dozama 1, 5 i 10  $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ ) intratekalno. Antinociceptivno djelovanje je ispitivano formalinskim testom.

AP5 je smanjio bolni odgovor uzrokovan formalinom u prvoj-akutnoj i drugoj-upalnoj fazi, dok je BT-A smanjio samo upalnu fazu formalinskog testa. Kombinacijom BT-A i AP5 postignut je sinergistički učinak u smanjenju boli u obje faze testa.

Dobiveni rezultati ukazuju na interakciju između BT-A i glutamatnog sustava u procesu nocicepcije čime se otvara novo područje istraživanja koje bi moglo ponuditi odgovore na pitanja o još uvijek nejasnom mehanizmu antinociceptivnog djelovanja BT-A.

Potencijalni sinergizam između BT-A i niskih, ali sigurnih doza NMDA antagonista mogao bi utjecati na dizajniranje kliničkih studija kako bi se ispitala djelotvornost i sigurnost ovakvih kombinacija u ljudi.

## SUMMARY

Clinical studies have shown that BT-A decreases pain for several months after single local injection. In addition, numerous researches suggest that peripheral application of BT-A decreases glutamate release from peripheral endings of primary afferent neurons. Due to a fact that glutamate is the most important excitatory neurotransmitter in nociceptive pathways, it is possible that BT-A inhibits glutamate release in central synapses. Hypothesis of this research is that BT-A increases analgesic effect of low doses of glutamate antagonists at spinal cord level. Male Wistar rats were injected subcutaneously into the rat hindpaw with BT-A(5 i.j./kg). Competitive NMDA antagonist 2-amino-5-phosphonopentanoate (AP5 in doses 1, 5, 10  $\mu$ l/ 10  $\mu$ l) was administered intrathecally. Antinociceptive effect was examined with formalin test. AP5 reduced pain response in first-acute and second-inflammatory phase of formalin test, while BT-A reduced pain response only in second phase of formalin test. Synergistic effect in pain response reduction was observed in a group that was given BT-A and AP5. Results of this work indicate interaction between BT-A and central glutamate system in nociception process, which opens a new area for future researches that could provide answers for still unknown mechanism of antinociceptive effect of BT-A. Potential synergism between BT-A and smaller, but safer doses of NMDA antagonists could have impact on design of clinical studies to evaluate efficacy and safety of these combinations in humans.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za farmakologiju  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### POVEZANOST CENTRALNOG GLUTAMATNOG SUSTAVA S ANTINOCICEPTIVNIM UČINKOM BOTULINUM TOKSINA TIPA A

Luciano Blažević

#### SAŽETAK

Kliničke studije pokazuju da jednokratno lokalno primijenjen BT-A smanjuje bol tijekom nekoliko mjeseci. Nadalje, brojna eksperimentalna istraživanja ukazuju da primjena botulinum toksina smanjuje lučenje glutamata iz perifernih završetaka primarnih aferentnih neurona. Budući da je glutamat najvažniji ekscitacijski neurotransmiter u nociceptivnom putu, moguće je da BT-A inhibira lučenje glutamata i u središnjim sinapsama. Hipoteza ovog istraživanja je da BT-A povećava analgetski učinak niskih doza antagonista glutamata interakcijom na razini kralješničke moždine.

Ispitivanja su provedena na mužjacima štakora soja Wistar. BT-A (5 i.j./kg) je primijenjen intraplanarno, a kompetitivni antagonist NMDA receptora 2-amino-5-fosfonopentanoična kiselina (AP5 u dozama 1, 5 i 10 µg/10µl) intratekalno. Antinociceptivno djelovanje je ispitivano u formalinskom testu.

AP5 je smanjio bolni odgovor uzrokovan formalinom u prvoj-akutnoj i drugoj-upalnoj fazi, dok je BT-A smanjio samo upalnu fazu formalinskog testa. Kombinacijom BT-A i AP5 postignut je sinergistički učinak u smanjenju boli u obje faze testa.

Dobiveni rezultati ukazuju na interakciju između BT-A i glutamatnog sustava u procesu nocicepcije čime se otvara novo područje istraživanja koje bi moglo ponuditi odgovore na pitanja o još uvijek nejasnom mehanizmu antinociceptivnog djelovanja BT-A.

Potencijalni sinergizam između BT-A i niskih, ali sigurnih doza NMDA antagonista mogao bi utjecati na dizajniranje kliničkih studija kako bi se ispitala djelotvornost i sigurnost ovakvih kombinacija u ljudima.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 34 stranice, 6 grafičkih prikaza, 3 tablice i 61 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: botulinum toksin, glutamat, antagonist NMDA receptora, bol, formalinski test, štakor

Mentor: **Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači:

**Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Živka Juričić**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Jasna Jablan**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: travanj 2017.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmacology  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### INVOLVEMENT OF CENTRAL GLUTAMATE SYSTEM IN ANTINOCICEPTIVE EFFECT OF BOTULINUM TOXIN TYPE A

Luciano Blažević

#### SUMMARY

Clinical studies have shown that BT-A decreases pain for several months after single local injection. In addition, numerous researches suggest that peripheral application of BT-A decreases glutamate release from peripheral endings of primary afferent neurons. Due to a fact that glutamate is the most important excitatory neurotransmitter in nociceptive pathways, it is possible that BT-A inhibits glutamate release in central synapses. Hypothesis of this research is that BT-A increases analgesic effect of low doses of glutamate antagonists at spinal cord level. Male Wistar rats were injected subcutaneously into the rat hindpaw with BT-A(5 i.j./kg). Competitive NMDA antagonist 2-amino-5-phosphonopentanoate (AP5 in doses 1, 5, 10  $\mu$ l/ 10  $\mu$ l) was administered intrathecally. Antinociceptive effect was examined with formalin test. AP5 reduced pain response in first-acute and second-inflammatory phase of formalin test, while BT-A reduced pain response only in second phase of formalin test. Synergistic effect in pain response reduction was observed in a group that was given BT-A and AP5. Results of this work indicate interaction between BT-A and central glutamate system in nociception process, which opens a new area for future researches that could provide answers for still unknown mechanism of antinociceptive effect of BT-A. Potential synergism between BT-A and smaller, but safer doses of NMDA antagonists could have impact on design of clinical studies that would evaluate efficacy and safety of these combinations in humans.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 34 pages, 6 figures, 3 tables and 61 references. Original is in Croatian language.

Keywords: botulinum toxin, glutamate, NMDA receptor antagonist, pain, formalin test, rat

Mentor: **Lidija Bach-Rojecky, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers:

**Lidija Bach-Rojecky, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Živka Juričić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Jasna Jablan, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: April 2017.