

Utjecaj botulinum toksina tipa A na aktivaciju neurona u talamusu u modelu upalne boli

Bulović, Ena

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:163:736846>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-13**



Repository / Repozitorij:

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



Ena Bulović

**Utjecaj botulinum toksina tipa A na aktivaciju
neurona u talamusu u modelu upalne boli**

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 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Lidije Bach-Rojecky.

Zahvaljujem svojoj metorici izv. prof. dr. sc. Lidiji Bach-Rojecky na uzornosti, inspiraciji i prenesenom znanju tijekom studija. Hvala na prilici, strpljenju i pomoći prilikom izrade ovog rada. Srdačno zahvaljujem i dr.sc. Višnji Drinovac Vlah, znanstvenoj novakinji Zavoda za farmakologiju na nesebičnoj pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada i obrade rezultata.

Veliko hvala svim mojim prijateljima i obitelji na uspomnama, smijehu i suzama koje smo zajedno doživjeli. Posebno hvala upućujem mojim roditeljima koji su vjerovali u mene čak i onda kada ja nisam.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Bol	1
1.1.1. Podjela boli	1
1.1.2. Putovi prijenosa bolnog impulsa	3
1.1.3. Neurotransmitori u prijenosu boli	5
1.1.4. Senzitivizacija kao osnova razvoja kronične boli	6
1.1.5. Modulacija bolnog impulsa	7
1.1.6. Terapija boli	8
1.2. Botulinum toksin	9
1.2.1. Strukturne karakteristike neurotoksičnog kompleksa i botulinum toksina A	10
1.2.2. Mehanizam djelovanja botulinum toksina	11
1.2.3. Botulinum toksin u kliničkoj praksi	12
1.2.4. Analgetski učinak botulinum toksina	13
1.3. Struktura i mehanizam djelovanja c-Fos-a	15
1.3.1. c-Fos kao marker neuronalne aktivacije kod boli	16
2. OBRAZLOŽENJE TEME	18
3. MATERIJALI I METODE	19
3.1. Životinjsko tkivo	19
3.2. Ispitivana tvar: botulinum toksin tipa A	19
3.3. Kemikalije	20
3.4. Eksperimentalni protokol	20
3.5. Kemikalije	21
3.6. Priprema tkiva za imunohistokemijsku analizu	21
3.7. Imunohistokemija	21
3.8. Statistička analiza	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
5. ZAKLJUČAK	28
6. LITERATURA	29
7. SAŽETAK	35

1. UVOD

1.1. Bol

Svjetsko udruženje za bol (engl., *International Association for the Study of Pain*, IASP) definira bol kao neugodan emocionalni i osjetni doživljaj povezan sa stvarnim ili potencijalnim oštećenjem tkiva. Prema tome, bol i *percepcija boli* nastaju složenom centralnom obradom podražaja s periferije koja ne ovisi samo o prijenosu živčanih signala, nego i o emocionalnim čimbenicima. Bol potiče reakcije čiji je cilj uklanjanje bolnog podražaja uzrokovanog patofiziološkim promjenama te se smatra zaštitnim mehanizmom. (Guyton i Hall, 2012).

1.1.1. Podjela boli

Bol je moguće podijeliti prema porijeklu, trajanju, etiologiji, intenzitetu i simptomima (Bach-Rojecky, 2006).

Bol može poticati iz različito lokaliziranih tkiva (npr. glava, leđa, vrat) i tkiva različitih funkcija (npr. mišićna, koštana, neurološka, vaskularna). Ovakva podjela je anatomska i, iako korisna u postavljanju dijagnoze, ne daje podatke o mehanizmu koji je doveo do boli (prema smjernicama Svjetske zdravstvene organizacije).

Prema trajanju, bol se može razvrstati u **akutnu** (brzu) i **kroničnu** (sporu).

Akutna bol nastaje naglo i izravno je povezana s oštećenjem (npr. bol zbog ozljede). Njezina je funkcija adaptivno-zaštitna, t.j. uzrokuje povećanje osjetljivosti na podražaje kako bi se izbjegli vanjski utjecaji i osiguralo cijeljenje. Nakon uklanjanja uzroka njezin intenzitet se smanjuje. Kronična bol traje dulje vrijeme (dulje od 3 mjeseca), a rezultat je trajnog patološkog poremećaja (npr. bol kod osteoartritisa). Može biti kontinuirana ili se ponavljati u određenim intervalima ili pri određenim aktivnostima (Puljak i Sapunar, 2014). S obzirom da se zbog fenomena senzitizacije bol učestalim ponavljanjem pogoršava, kroničnu je bol puno teže liječiti.

Ovisno o etiologiji bol dijelimo na nociceptivnu, neuropatsku i upalnu.

Nociceptivna bol je posljedica podraživanja specifičnih živčanih završetaka, t.j. receptora za bol (nociceptora). Osjetljivi su na akutne podražaje kao što su toplina, hladnoća te mehaničke (npr. rastezanje, vibracije) i kemijske čimbenike, a njihovom aktivacijom stvara se impuls koji

se ascendentno prenosi prema centrima za bol u mozgu. Podraživanje perifernih nociceptora u oštećenom tkivu uzrokuje lokaliziranu, somatsku bol, dok podraživanjem nociceptora unutarnjih organa nastaje difuzna, visceralna bol. Nociceptivna bol smatra se ključnim obrambenim mehanizmom organizma kod tkivnih ozljeda (Bach-Rojecky, 2006). **Neuropatska bol** je oblik difuzne i kronične boli uzrokovan oštećenjem ili disfunkcijom dijelova živčanog sustava. Te patološke promjene moguće su na centralnoj ili perifernoj razini. Nerijetko je neuropatska bol posljedica kombinacije promjena na obje razine zbog čega je njezina patofiziologija izrazito složena, a uspješnost liječenja ograničena (Karadža i sur, 2003).

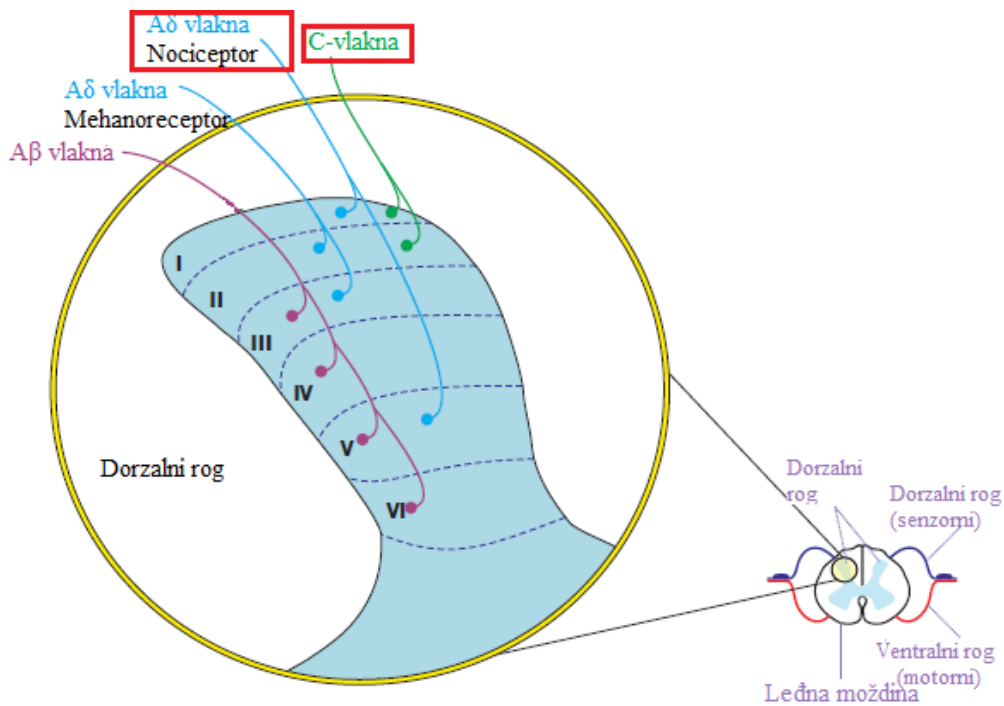
Ozljeda tkiva rezultira perifernim oslobađanjem medijatora upale kao što su ioni (K^+ , H^+), bradikinin, histamin, serotonin, ATP i dušični monoksid iz oštećenih stanica. Razgradnjom arahidonske kiseline iz stanične membrane nastaju prostanoidi i leukotrieni. Privučene imunosne stanice otpuštaju dodatne upalne medijatore kao što su citokini i faktori rasta (neurotropni faktor rasta, NGF). Ti će procesi rezultirati pojavom **upalne boli**. Neki od navedenih medijatora upale kao što su ATP, serotonin i ioni direktno aktiviraju periferne nociceptore, dok će drugi djelovati senzitivirajuće. Aktivacijom nociceptora nastaje živčani impuls koji se ortodromno prenosi u kralježničnu moždinu, ali i antidromno u kolateralne živčane završetke istog nociceptora iz kojih se u koži luče neuropeptidi kao što su supstancija P i CGRP. Supstancija P uzrokuje vazodilataciju, a CGRP povećava kapilarnu permeabilnost te na taj način dodatno doprinose upali. Senzitivatori pridonose stvaranju bolnog podražaja indirektno, stimulacijom otpuštanja algogenih tvari (tvari koje izazivaju bol) iz stanica koje okružuju nociceptore. Također, oni mogu smanjivati prag podražljivosti nociceptora. Primjerice, prostaglandini mogu povisiti razinu drugog glasnika, intracelularnog cAMP-a (ciklički adenzin monofosfat) ili povećati razinu aktivnosti natrijevih kanala djelovanjem preko protein kinaze A. Kronična upala i s njom povezana dugotrajna i ponavljajuća aktivacija perifernih nociceptora može dovesti do promjena u središnjem živčanom sustavu poput središnje senzitivacije, i promjena u transkripciji gena za molekule uključene u proces nocicepcije (Kidd i Urban, 2001; Bach-Rojecky, 2006).

Prema intenzitetu, Svjetska zdravstvena organizacija bol klasificira u tri kategorije. To su blaga do umjerena, umjereno jaka i vrlo jaka bol. Takva podjela pomaže u ocjeni razvoja osnovne bolesti i omogućava uspoređivanje jačine boli među pacijentima.

1.1.2. Putovi prijenosa bolnog impulsa

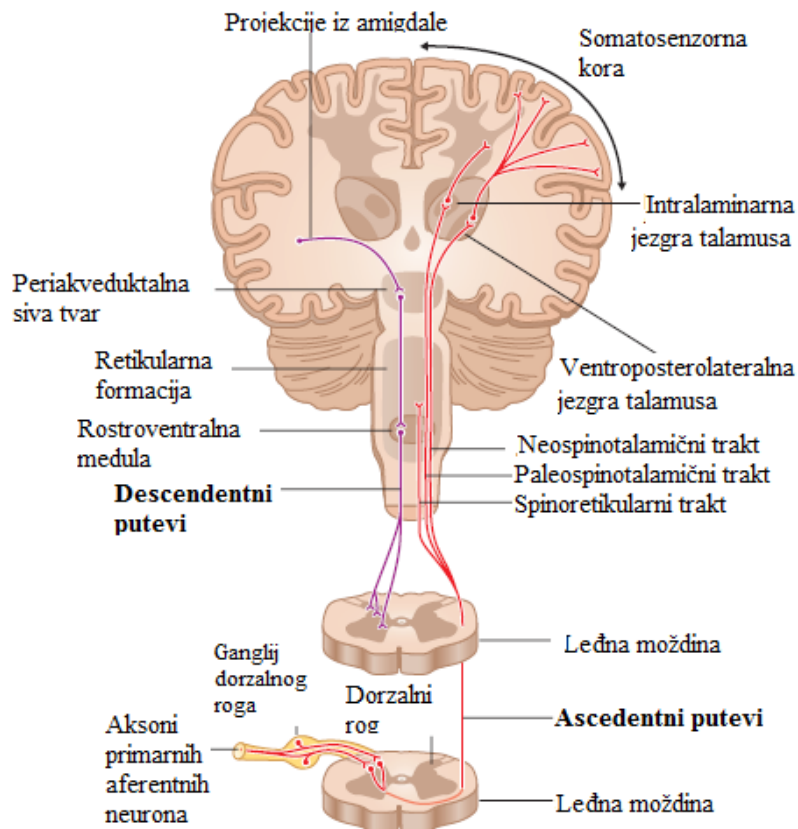
Receptori za bol ili nociceptori su ogoljeni živčani završeci prisutni u površinskim slojevima kože, pokosnice, stijenkama arterija, zglobnim površinama te tkivima unutarnjih organa (Giroto i sur, 2012). S obzirom da (za razliku od mehanoreceptora) nisu obavijeni staničnom kapsulom, nezaštićeni su od izlučenih ili unesenih kemijskih tvari. Iako reagiraju na velik broj podražaja, u fiziološkim uvjetima se aktiviraju tek pri visokim intenzitetima podraživanja. Podraživanjem se otvaraju ionski kanali, mijenja ionska propusnost nociceptora i posljedično stvara akcijski potencijal čime se zaključuje proces *transdukcije* (Bach-Rojecky, 2006; Giroto i sur., 2012).

Prema vrsti podražaja na koji reagiraju, dijele se na A δ nociceptore koji odgovaraju na mehaničke podražaje i C-nociceptore koji su polimodalni, odnosno aktivirani različitim vrstama podražaja (mehanički, toplinski, kemijski). Impulse nastale u nociceptorima u središnji živčani sustav prenose aferentna živčana vlakna različitih svojstava (*kondukcija*). A δ vlakna su mijelinizirana i odgovorna za prijenos oštre i dobro lokalizirane boli brzinom 6-30 m/s, a nemijelinizirana C vlakna provode tupu, loše lokaliziranu bol brzinom 0,5-2 m/s (Bach-Rojecky, 2006; Guyton i Hall, 2012). Zbog dvostruke inervacije receptora za bol bolni podražaj često uzrokuje dvostruki osjet boli. A δ i C vlakna dorzalnim spinalnim korijenima ulaze u kralježničnu moždinu i u dorzalnom rogu kralježnične moždine formiraju sinapse. Lučenjem neurotransmitora u sinapse aktiviraju sekundarne neurone u različitim laminama, ovisno o tipu vlakna i mjestu u tijelu gdje je bolni podražaj nastao (slika 1). Nakon ulaska u kralježničnu moždinu, bolni signali putuju prema mozgu preko neospinalamičnog, spinoretikularnog i paleospinalamičnog trakta (slika 2). Taj se proces naziva *transmisijom*.



Slika 1. Putevi živčanih vlakana iz periferije u dorzalni rog kralježnične moždine (prilagođeno prema Bullock i Hales, 2013)

Djelovanjem glutamata lučenog iz A δ vlakna, u lamini I (marginalna lamina) pobuđuju se sekundarni neuroni neospinotalamičnog i spinoretikularnog trakta. Njihova duga vlakna prednjom komisurou prelaze na suprotnu stranu kralježnične moždine te se anterolateralnim kolumnama penju prema mozgu. Vlakna spinoretikularnog trakta završavaju u retikularnim područjima moždanog debla, a vlakna neospinotalamičnog trakta neprekinuta odlaze u talamus i završavaju u ventrobazalnom kompleksu ili na stražnjoj skupini talamičnih jezgara. Signali se iz navedenih područja prenose u druga bazalna područja mozga i sematosenzoričku koru bitnu za lokalizaciju i percepciju boli (Bullock i Hales, 2013; Guyton i Hall, 2012). Paleospinotalamički put prenosi bolne podražaje koji su većinom C, ali dijelom i A δ vlaknima pristigli u lamine II i III (gelatinozna tvar). Aksonski završeci tih vlakana oslobađaju glutamat i tvar P te ekscitiraju sekundarne neurone koji se združuju s vlaknima brzog puta. Nakon prelaska na supronu stranu kralježnične moždine, aksoni se anterolateralnim putem penju prema brojnim nižim regijama mozga kao što su produljena moždina, pons i mezencefalon. Manji dio vlakana neprekinut završava u talamusu (Guyton i Hall, 2012).



Slika 2. Prijenos bolnog signala spinotalamičnim i spinoretikularnim traktovima (prilagođeno prema Bullock i Hales, 2013)

1.1.3. Neurotransmitori u prijenosu boli

Neurotransmitori su kemijski posrednici koji aktiviraju nociceptore. Mogu djelovati ekscitacijski ili inhibicijski na doživljaj i prijenos bolnog podražaja. Glavni ekscitacijski neurotransmitori su glutamat, aspartat i supstancija P, a glavni inhibicijski neurotransmitor GABA (Karadža i sur., 2003). Glutamat je najzastupljeniji, djeluje brzo i s trajanjem od nekoliko milisekundi (Guyton i Hall, 2012). Lučenje glutamata iz živčanih završetaka posljedica je aktivacije specifičnih receptora kao što su vaniloidni TRPV1 receptori (engl., *transient receptor potential cation channel subfamily V member 1*) i ionskih kanala kao što su ASIC (engl., *acid-sensing ion channels*). Djeluje preko ionotropnih AMPA (α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kiselina) i NMDA (N-metil-D-aspartat) te kainatnih receptora na perifernim završecima aferentnih neurona, neuronima dorzalnog roga kralježnične moždine i talamičkim neuronima. Pri upali se pojačano izlučuje iz nociceptora i okolnih stanica zajedno sa supstancijom P, čije se djelovanje povezuje sa sporom boli te

CGRP (engl., *calcitonin gene related peptide*). U dorzalnom rogu kralježnične moždine glutamat može djelovati i na presinaptičke NMDA receptore na membranama središnjih grana aferentnog senzornog vlakna, što za posljedicu ima povećano lučenje neurotransmitora (Bach-Rojecky, 2006). Od ostalih tvari u transmisiji bolnih impulsa značajni su tahikinini, somatostatin, faktor lučenja kortikotropina (CRF), kolecistokinin, galanin i vazoaktivni intestinalni peptid (VIP). Pojačanju ili inhibiciji bolnih signala mogu doprinijeti medijatori iz ne-živčanih izvora kao što su adenzin tri-fosfat (ATP), dušikov (II) oksid (NO), prostaglandini (PG) i neurotropini (Milan, 1999).

1.1.4. Senzitivizacija kao osnova razvoja kronične boli

Za razliku od većine osjetnih receptora u tijelu, receptori za bol se slabo prilagođavaju. Dugotrajni podražaji povećavaju njihovu osjetljivost.

Povećanje podražljivosti perifernih receptora pod utjecajem oslobođenih tvari naziva se perifernom (primarnom) senzitivizacijom. Centralnu (sekundarnu) senzitivizaciju definiramo kao porast podražljivosti neurona dorzalnog roga kralježnične moždine (Puljak i Sapunar, 2014). U perifernoj senzitivizaciji najvažniji upalni medijatori su prostaglandini. Oni sami nisu u mogućnosti podražiti, ali mogu povećati osjetljivost nociceptora i promovirati otpuštanje bradikinina, potentnih aktivatora nociceptora. Njihovo vezivanje za metabotropne receptore na membranama perifernih aferentnih završetaka aktivira sustav drugih glasnika što rezultira fosforilacijom ionskih kanala i receptora te smanjenjem praga njihove aktivacije. Posljedično sve više signala ulazi u dorzalni rog kralježnične moždine. Povećava se lučenje glutamata iz primarnih neurona. Glutamat aktivira NMDA receptore sekundarnih neurona koji djeluju kao kationski kanali. Povećava se postsinaptička koncentracija Ca^{2+} iona i aktivira neuronalna sintetaza dušikovog oksida koja katalizira stvaranje NO. Nastali NO difundira u presinaptički neuron gdje aktivira kaskadu NO-ciklički gvanozin monofosfat što povećava lučenje ekscitacijskih aminokiselina i supstancije P. Povećava se i broj NMDA receptora zbog čega se prag osjetljivosti središnjih neurona smanjuje. U kasnijim fazama centralne senzitivizacije dolazi do transkripcijskih promjena, odnosno povećane ekspresije gena za c-Fos i ciklooksigenazu₂ (COX₂) što za posljedicu ima povećanu sintezu prostaglandina koji, kao što je ranije navedeno, povećavaju osjetljivost receptora (Bullock i Hales, 2013; Bach-Rojecky, 2006).

Senzitivizacija je važna su u procesu cijeljenja pri oštećenju tkiva, ali je i ključni dio zbivanja

kod razvijanja kronične boli karakterizirane hiperalgezijom (povećana osjetljivost na bolne podražaje) i alodinijom (povećana osjetljivost na podražaje koji nisu bolni) (Bullock i Hales, 2013; Puljak i Sapunar, 2014). Dok su mehanizmi nastanka primarne hiperalgezije (nastale na mjestu ozljede) poznati i uključuju događaje na razini nociceptora, za održavanje sekundarne hiperalgezije (nastale izvan mjesta ozljede) i alodinije eksperimentalno je dokazana neovisnost o zbivanjima na periferiji. Smatra se da u održavanju takvih tipova preosjetljivosti dodatnu ulogu imaju reorganizacija neurona i aktivacija A β vlakana (Bach-Rojecky, 2006)

1.1.5. Modulacija bolnog impulsa

Intenzitet reakcije na bol razlikuje se od osobe do osobe, što je djelomično posljedica sposobnosti mozga da aktivira analgezijski sustav. On potiskuje ulazak bolnih signala u živčani sustav i tako sudjeluje u nadzoru boli. Descendentni inhibitorni putevi blokiraju nocicepciju u dorzalnog rogu kralježnične moždine i omogućavaju normalnu i od boli oslobođenu moždanu aktivnost.

Inhibicijom GABA-ergičnih neurona moždanog korteksa aktivira se siva tvar oko akvedukta (*periaqueductal grey*, PAG). To je okidač za pokretanje lančane reakcije kojom se aktiviraju velike jezgre rafe (*nucleus raphe magnus*, NRM) u rostroventralnoj meduli i locus coeruleus (LC) u moždanom deblu. Navedene strukture pružaju svoje aksone do dorzalnog roga kralježnične moždine i to do dvije moguće lokacije - sinapse između dolazećih C i A δ vlakna i sekundarnih, spinotalamičkih i spinoretikularnih neurona te do interneurona u području gelatinozne tvari dorzalnog roga (lamina III). Tako endogeni analgezijski mehanizmi mogu zaustaviti bolne signale prije nego što se oni prekopčaju i krenu prema mozgu.

Nekoliko neurotransmitora uključeno je u djelovanje analgezijskog sustava. Putovi koji potječu iz NRM luče enkefaline i serotonin, dok će neuroni LC-a lučiti noradrenalin. Interneuroni gelatinozne tvari uz enkefaline izlučuju i dinorfine, gama-aminobutiričnu kiselinu (GABA) i kolekistokinin (CCK). Enkefalini, dinorfini i endorfini su važne endogene opioidne tvari koje vezanjem na presinaptičke opioidne receptore inhibiraju otpuštanje neurotransmitora iz C i A δ vlakana. Također, isto kao i noradrenalin, GABA, CCK i serotonin, vezanjem na postsinaptičke receptore izazivaju hiperpolarizaciju neurona i posljedično povećavaju njihov podražajni prag i sprječavaju aktivaciju.

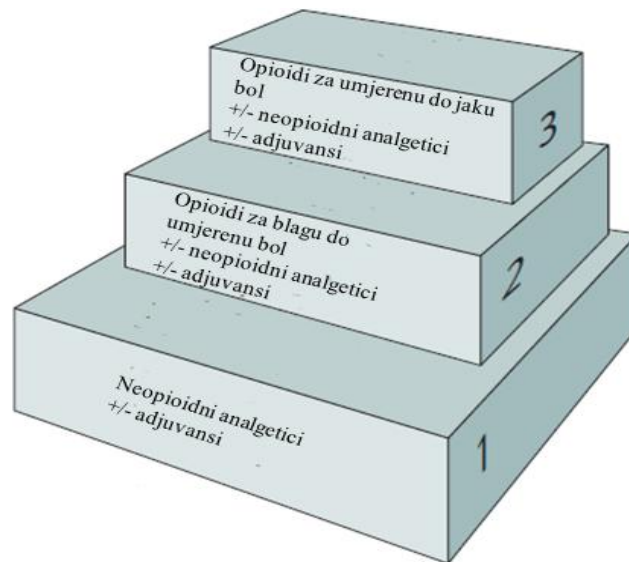
1.1.6. Terapija boli

Ključni korak u planiranju liječenja boli je evaluacija. Bol mora biti ocijenjena iz multidimenzionalne perspektive. Uz određivanje vrste boli u evaluaciju su uključeni i fizički, psihički, psihosocijalni faktori, ponašanje pacijenta i utjecaj boli na normalne životne funkcije. Uporaba analgetika temelji se na algoritmu liječenja Svjetske zdravstvene organizacije koji uključuje tri stupnja boli (Slika 3). Ljestvica je temeljena na dva moguća pristupa terapiji boli:

1. Neopiodni analgetici kao što su nesteroidni anti-inflamatorni lijekovi (NSAIL) ili paracetamol reduciraju sintezu prostaglandina blokiranjem enzima ciklooksigenaze na periferiji i kralježničnoj moždini koriste se kod blage do umjerene boli.

2. Opioidni analgetici kao što su kodein (za blagu do umjerenu bol) i morfin (za umjerenu do jaku bol) djeluju na tri razine. Supraspinalno aktiviraju silazne inhibicijske puteve, spinalno smanjuju lučenje ekscitacijskih neurotransmitora i transmisiju te inhibiraju perifernu senzitivaciju. Koriste se u terapiji boli jakog intenziteta.

U liječenju kroničnih bolnih stanja klasični analgetici obično nisu dovoljno djelotvorni pa se tada uvodi adjuvantna terapija lijekovima koji primarno nisu analgetici. Tako se u liječenju neuropatske boli koriste lokalni anestetici (lidokain) i triciklički antidepresivi poput amitriptilina i imipramina koji djeluju na Na-kanale i pritom stabiliziraju neuralnu membranu te blokatori N-tipa Ca^{2+} kanala kao što je antiepileptik gabapentin. Oni svojim učinkom utječu na nastanak i/ili provođenje bolnih impulsa na periferiji i/ili centralnom živčanom sustavu i tako ublažavaju bol (Bach-Rojecky, 2006).



Slika 3. Trostupanjska skala boli (prilagođeno prema Bullock i Hales, 2013)

Terapija boli može uključivati nefarmakološke mjere. One obuhvaćaju korištenje topline, hladnoće, električnu stimulaciju, imobilizaciju, relaksacijske tehnike i vježbanje. Primjena topline reducira brzinu provodnosti impulsa, opušta mišiće i povećava protok krvi u oštećeno područje. Hladnoća izaziva vazokonstrikciju, smanjuje krvarenje i akumulaciju proupalnih medijatora te utječe na brzinu provodnosti vlakana. Transkutanom električnom stimulacijom inhibira se putovanje impulsa putem C vlakana i povećava otpuštanje endorfina i enkefalina, endogenih analgetskih agenasa (Bullock i Hales, 2013).

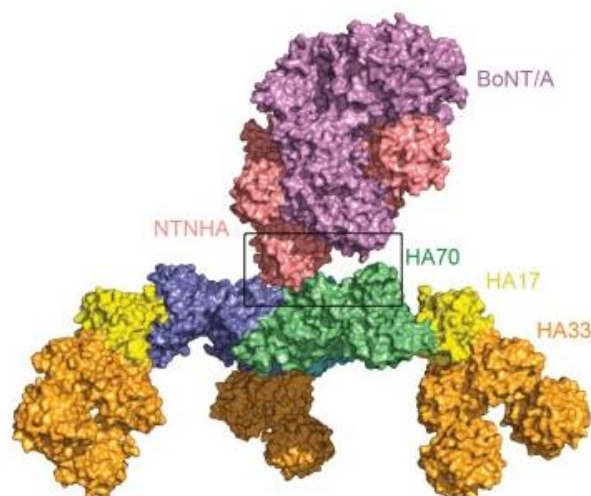
1.2. Botulinum toksin

Botulinum toksin je egzotoksin kojeg stvaraju gram-pozitivni sporogeni anaerobni bacili roda *Clostridium* (*C. botulinum*, *C. baratii*, *C. butyricum*). Poznato je sedam neurotoksičnih serotipova botulinum toksina: A, B, C1, D, E, F i G. Serotip C2 smatra se toksinom vaskularne permeabilnosti (Said i sur., 2003; Ohishi i sur. 1981). Nedavno je otkriven novi soj *C. botulinum* koji stvara dosad neistražen H serotip neurotoksina (Barash i Arnon, 2013). Botulinum toksine čovjek može unijeti putem hrane i inhalacijski, a moguća je i ingestija termostabilnih spora kod novorođenčadi ili njihov prodor kroz otvorene rane (prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji). Nakon apsorpcije toksini se krvlju šire do neuromuskularnih sinapsi gdje interferiraju s prijenosom signala blokirajući otpuštanje neurotransmitora acetilkolina te pritom uzrokuju paralizu mišića (Nigam i Nigam, 2010).

Uobičajeni simptomi botulizma su mišićna slabost, zamagljen vid i teškoće pri gutanju i disanju, a u terapiji se može koristiti antidot- antitoksin (Timbrell, 2009). Zbog vrlo visoke potentnosti letalna doza botulinum toksina iznosi već 70 µg kod oralne primjene i 0.80 do 0.90 µg kod inhaliranja (Sobel, 2005). Usprkos izrazitoj toksičnosti i riziku zlouporabe (bioterrorizam), a zahvaljujući visokim standardima u izolaciji, pripremi i strogim sigurnosnim zahtjevima, botulinum toksin danas ima značajnu ulogu u dermatologiji, estetici i terapiji brojnih spastičkih neuromuskularnih i osjetnih poremećaja (Kumar i sur., 2016; Said i sur. 2003). U kliničkoj praksi trenutno se koriste serotipovi A i B, a zbog svojih poželjnih svojstava (kraće vrijeme oporavka) klinički potencijal pokazuje i serotip F (Timbrell, 2009; Jabbari, 2015).

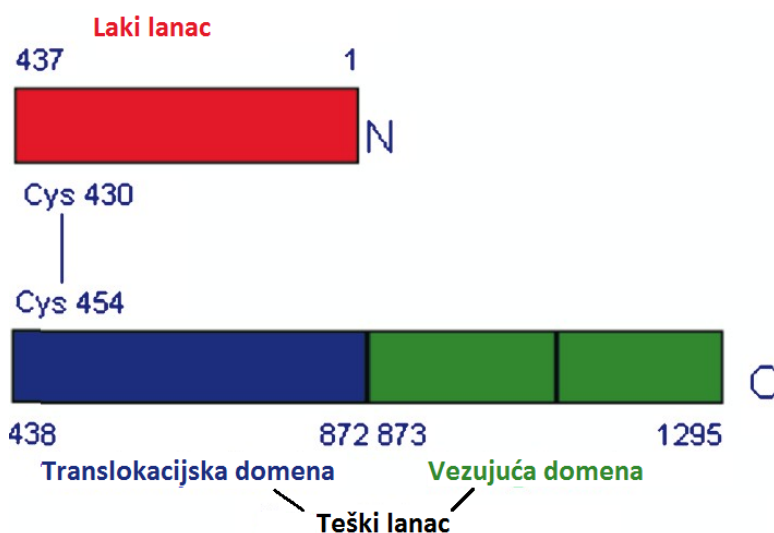
1.2.1. Strukturne karakteristike neurotoksičnog kompleksa i botulinum toksina A

Botulinum toksin tipa A (BT-A) je biološki aktivna komponenta neurotoksičnog kompleksa PTC (engl., *progenitor toxin complex*) čija molekulska težina iznosi između 500 i 900 kDa. U sklopu kompleksa, BT-A je povezan s netoksičnim proteinima (engl., *neurotoxin associated proteins, NAPs*) koji mogu biti hemaglutininski ili nehemaglutininski. Hemaglutininski NAP-ovi osiguravaju uspješnu apsorpciju toksina transcitozom zahvaljujući vezanju na sijalinsku kiselinu u mukoznom sloju stijenke gastrointestinalnog trakta (Jabbara, 2015; Jin i sur., 2009). Uloga nehemaglutininskih NAP-ova je zaštita BT-A od kiselog pH i proteaza. Prilikom ulaska u cirkulaciju, zbog porasta pH, NAP-ovi se odvajaju i BT-A slobodan putuje krvlju (Kim i sur., 2015).



Slika 4. Struktura neurotoksičnog kompleksa (prilagođeno prema Lee i sur, 2013)

BT-A komponenta kompleksa je 150-kDa težak jednolančani polipeptid čijim cijepanjem nastaju teški (*heavy chain*, HC, 100 kDa) i laki lanac (*light chain*, LC, 50 kDa) međusobno povezani disulfidnom vezom preko cisteinskih ostataka. Teški lanac sastoji se od dvije domene važne za vezivanje BT-A i translokaciju lakog lanca u ciljni neuron, a laki lanac pokazuje o cinku ovisnu endopeptidaznu aktivnost (Aoki, 2003; Slika 5).

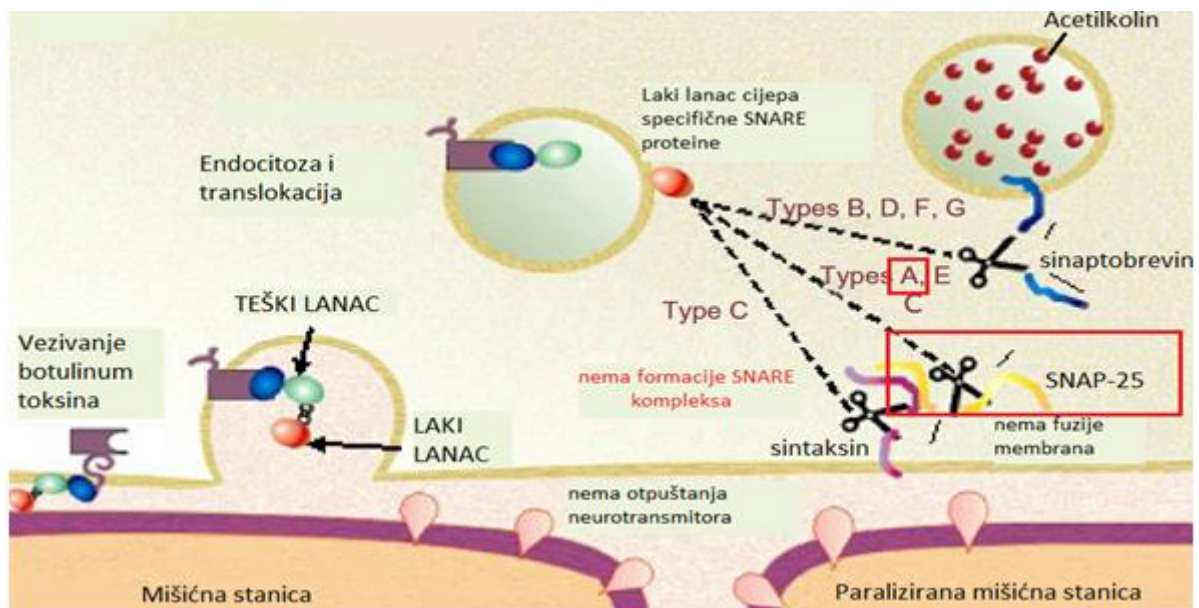


Slika 5. Prikaz strukture botulinum toksina A (prilagođeno prema Dhaked i sur., 2010)

1.2.2. Mehanizam djelovanja botulinum toksina

Iako točan mehanizam djelovanja BT-A nije još u potpunosti razjašnjen, dosadašnjim istraživanjima utvrđeno je nekoliko koraka bitnih za njegovo djelovanje. Prvi korak je vezivanje BT-A na receptore na membrani presinaptičkog neurona u neuromuskularnoj sinapsi. Interakcijom visokog afiniteta između teškog lanca i poligangliozida nastaje kompleks koji se pomiče prema glikoproteinskom receptoru za koji je toksin specifičan. Tako će se BT-A vezati za receptor SV2 (engl., *synaptic vesicle glycoprotein 2*), kao i serotipovi D, E i F, a serotipovi B i G vežu se za sinaptotagmin (Kumar i sur., 2016). Idući korak je internalizacija toksina endocitozom. Kiseli pH endosoma izaziva promjenu konformacije teškog i lakog lanca toksina, a redoks sustav osigurava redukciju disulfidnih veza između lanaca što omogućuje njihovo odvajanje (Kim i sur., 2015). Teški lanac otvara kanale za translokaciju lakog lanca iz endosoma u citosol (Jabbara, 2015). Laki lanac BT-A u citosolu djeluje kao metaloproteinaza koja katalizira cijepanje proteina SNAP-25 (engl.,

synaptosomal-associated protein) zbog čega on gubi svoju fiziološku funkciju. SNAP-25 zajedno sa sinaptobrevinom (engl., *vesicle-associated membrane protein*, VAMP) i sintaksinom čini superporodicu SNARE proteina (engl., *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor activating protein receptor*) čija je uloga fuzija membrane vezikule s neurotransmitorom i membrane neurona. Drugi serotipovi botulinum toksina mogu cijepati druge proteine SNARE superporodice (Slika 6), a posljedica je inhibiranje otpuštanja neurotransmitora iz presinaptičkog neurona u sinaptičku pukotinu (Simpson, 2004; Katzung i sur., 2012).



Slika 6. Prikaz molekularnog mehanizma djelovanja botulinum toksina (prilagođeno prema https://www.dovepress.com/cr_data/article_fulltext/s60000/60432/img/fig2.jpg)

1.2.3. Botulinum toksin u kliničkoj praksi

Iako vrlo potentan otrov, pročišćeni botulinum toksin se pokazao kao učinkovito terapijsko sredstvo. Početkom 20. stoljeća primijećeno je da injekcija botulinum toksina izaziva lokalnu paralizu mišića bez pojave botulizma te se tada počinje istraživati njegov učinak kod neuromuskularnih poremećaja (Turton i sur, 2002). Terapijsku primjenu BT-A FDA (engl., *Food and Drug Administration*) je prvi put odobrila 1989. godine za terapiju strabizma, blefarospazma i hemifacijalnog spazma. Kasnije su BT-A i BT-B odobreni za terapiju cervikalne distonije i spastičnih poremećaja različite etiologije. Tijekom godina terapijski spektar botulinum toksina se sve više širi i njegova je primjena danas moguća i u terapiji niza otorinolaringoloških, uroloških, gastrointestinalnih/proktoloških poremećaja te

boli (Janković, 2004; Trung i Jost, 2006). Zbog efikasnosti i relativne sigurnosti, uporaba botulinum toksina postala je uobičajena i u kozmetici te dermatologiji (npr. terapija aksilarne hiperhidroze). Istraživanja su pokazala 95 %-tnu učinkovitost u uklanjanju bora čela, između obrva, oko očiju te nazolabijalno već 24 do 72 sata nakon injekcije s učinkom u trajanju do 6 mjeseci (Said i sur., 2003). Ipak, botulinum toksini kod pacijenata mogu izazvati nelagodne nuspojave kao što su mišićna slabost, suhoća usta, ptoza vjeđe (kod primjene na licu) i disfagija (kod primjene u vrat).

Procedure odobravanja formulacija na bazi botulinum toksina su izrazito složene i variraju između različitih pripravaka i zemalja. Trenutno na tržištu postoji nekoliko različitih pripravaka baziranih na BT-A (Botox[®], Dysport[®], Xeomin[®] i CBTXA[®], dostupan samo u Kini) i BT-B (Myobloc[®]/NeuroBloc[®]). Potentnost im se izražava u internacionalnim jednicima (i.j.) pri čemu jedna jedinica odgovara količini koja nakon intraperitonealne primjene uzrokuje smrt 50 % miševa i nije ista kako za pojedini serotip, tako i za pojedini komercijalni pripravak. Zbog razlika u potentnosti i sigurnosti preporučene terapijske doze variraju između navedenih formulacija (Truong i Jost, 2006).

1.2.4. Analgetski učinak botulinum toksina

Poznat je i razjašnjen mehanizam cijepanja SNAP-25 proteina i inhibicija otpuštanja acetilkolina djelovanjem botulinum toksina u neuromuskularnoj sinapsi. Specifičnost BT-A za kolinergičke živčane završetke objašnjava se postojanjem specifičnih akceptora u terminalnoj membrani živaca. Mnoge živčane stanice ne posjeduju takve akceptore te se smatra da u njih BT-A ulazi u manjoj mjeri i to putem pinocitoze (Sim, 2011).

Međutim, eksperimentalno je dokazan suprimirajući učinak BT-A na lučenje drugih neurotransmitora i neuropeptida, kao što su noradrenalin, supstancija P, CGRP i glutamat. U ispitivanjima kod pacijenata s cervikalnom distonijom pokazano je da botulinum toksin, uz to što smanjuje mišićni tonus, ima i analgetski učinak koji nastaje prije i traje dulje od miorelaksirajućeg. Iz navedenih eksperimentalnih i kliničkih zapažanja može se zaključiti da BT-A djeluje na senzorne neurone te povoljno utječe na nocicepciju, perifernu i centralnu senzitivaciju. Antinociceptivni učinak BT-A dokazan je i u drugim oblicima kronične boli kao što su migrena i različiti tipovi neuropatskih boli koji nisu primarno povezani s povećanom mišićnom aktivnosti. Međutim, za razliku od paralitičkog mehanizma BT-A u

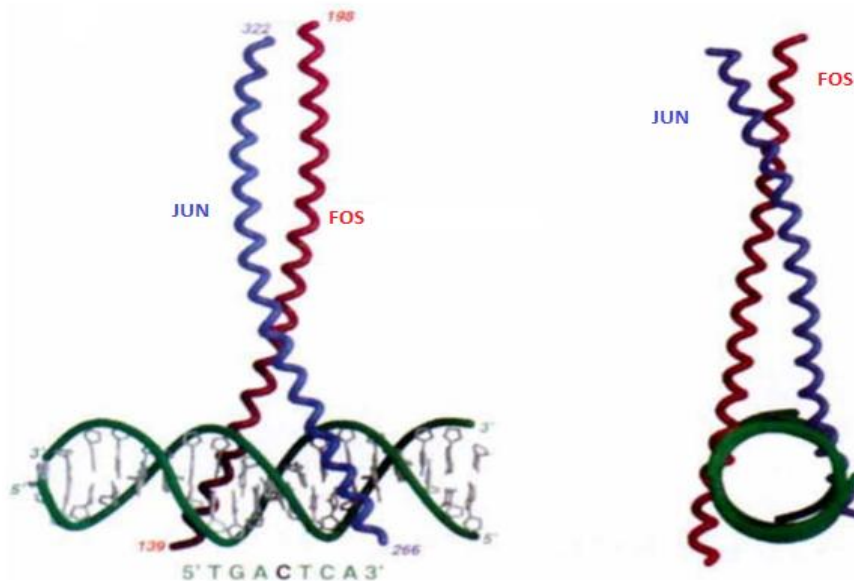
neuromuskularnoj sinapsi, karakteristike mogućeg djelovanja na senzorne neurone još uvijek su nejasne (Bach-Rojecky, 2006).

Prvotne hipoteze antinociceptivnog mehanizma BT-A uključuju dvije komponente - direktnu perifernu privremenu inhibiciju lučenja neuortransmitora i posljedičnu indirektnu inhibiciju centralne senzitivacije (Aoki i Francis, 2011). Periferna učinkovitost botulinum toksina pokazana je na upalnom modelu u štakora dobivenim subkutanim injiciranjem formalina. Subkutana injekcija BT-A reducirala je bol u sekundarnoj (inflamatornoj) bolnoj fazi uzrokovanoj povišenom razinom glutamata (Cui i sur, 2004). Također, antinociceptivni i antiinflamatorni učinci BT-A dokazani su i na ljudskom, kapsaicinom-induciranom, modelu boli (Gazerani i sur, 2006; Tugnoli i sur, 2007). Međutim, ispitivanja na modelu karagenanom i kapsaicinom uzrokovane upalne boli pokazala su da BT-A smanjuje mehaničku i toplinsku hiperalgeziju, ali ne i edem i ekstravazaciju proteina, što je dovelo u pitanje povezanost antinociceptivnih i protuupalnih učinaka BT-A (Bach-Rojecky i sur., 2008). Značajna su i kasnija istraživanja na modelu *zrcalne boli* središnjeg porijekla izazvanoj injiciranjem kisele fiziološke otopine (pH 4,0). Kod takvog oblika boli periferni živčani sustav ima zanemarivu ulogu te se ključnom komponentom dobivene kontralateralne hiperalgezije smatraju plastične promjene u SŽS-u (Sluka i sur., 2001). Uočeno je da periferna primjena BT-A u šapu štakora smanjuje bol na strani ozljede (ipsilateralno), ali i na suprotnoj strani (kontralateralno). S obzirom da se kontralateralni učinci ne mogu objasniti samo perifernim djelovanjem, zaključeno je da botulinum toksin djeluje i centralno (Bach-Rojecky i Lacković, 2009). Na temelju bihevioralnih studija i proučavanja inhibirajućeg utjecaja blokatora aksonalnog transporta kolhicina na aktivnost botulinum toksina pokazano je da je u mehanizam antinociceptivnog djelovanja uključen retrogradni aksonalni transport te učinak u dorzalnom rogu kralježnične moždine (Bach-Rojecky i Lacković, 2009).

Unatoč čvrstim dokazima o centralnom analgetskom djelovanju botulinum toksina, točan mehanizam i dalje ostaje većinom nepoznat. Međutim, istraživanja u kojima su korišteni antagonisti opioidnih (naltrekson) i GABA (bikukulin) receptora povezuju antinociceptivni učinak BT-A s endogenim opioidnim i GABA-ergičnim sustavom (Drinovac i sur, 2013) i otvaraju daljnje mogućnosti istraživanja mehanizma djelovanja botulinum toksina u središnjem živčanom sustavu.

1.3. Struktura i mehanizam djelovanja c-Fos-a

c-fos je protoonkogen, gen ranog odgovora (engl., *immediate early gene, IEG*), koji kodira za c-Fos, 62 kDa težak protein Fos porodice (Hoffman i sur, 1993). U Fos porodicu, uz c-Fos, ubrajaju se i proteini FosB, Fra-1 te Fra-2. Fos proteini su odgovorni za unutarstanične promjene izazvane izvanstaničnim signalima. Za njihovu strukturu karakterističan je motiv leucinskog zatvarača koji promovira dimerizaciju (Kovács, 1998; Harris, 1998). Iako postoje pokazatelji da je kod vrlo visoke ekspresije gena moguća homodimerizacija (Szalóki i sur., 2015), kristalografski je dokazano da su elektrostatske interakcije između podjedinica takve da je preferirani oblik heterodimer građen od α -uzvojnice Fos proteina i α -uzvojnice jednog od proteina Jun porodice (c-jun, JunB ili JunD), pri čemu nastaje transkripcijski faktor AP-1 (Glover i Harrison, 1995). Članovi Fos i Jun porodice prije dimerizacije posttranslacijski se modificiraju (fosforiliraju), što povećava njihov afinitet vezivanja za DNA. Nastali transkripcijski faktor veže se preko svojeg N-kraja za 5'-TGACTCA-3' slijed na DNA (AP-1 vezno mjesto) gdje djeluje kao promotor ili inhibitor ekspresije nizvodnih gena (Slika 7; Kovács, 1998). c-Fos protein je zahvaljujući transkripcijskoj aktivnosti uključen u mnoge biološke procese uključujući oblikovanje stanica i tkiva, proliferaciju, apoptozu i diferencijaciju, aktivaciju gena koji kodiraju enzime bitne u sintezi transmitora te u regulaciji sinteze neuropeptida kao što je luteinizirajući hormon, ali i enkefalina i dinorfina, opioidnih regulatora nocicepcije (Piechazyk i Blanchard, 1994; Hoffman i sur., 1993).



Slika 7. Prikaz AP-1 kompleksa i njegovog vezivanja na DNA (prilagođeno prema Glover i Harrison, 1995.)

1.3.1. c-Fos kao marker neuronalne aktivacije kod boli

Postoje dokazi da je c-Fos protein uključen u promjene u nocicepciji povezane sa centralnom senzitivacijom. Procesi koji dovode do hiperalgezije i alodinije induciraju ekspresiju opioidnih neuropeptida, endogenih analgetika. Sve više istraživanja govori o povezanosti povećane ekspresije c-Fos-a s povećanim stvaranjem dinorfina. Uočena je kolokalizacija ekspresije c-Fosa i dinorfina, a eksperimentalno je blokadom njegove ekspresije pomoću *antisense* oligodeoksinukleotida za *c-fos* mRNA dokazan regulatorni učinak c-Fosa na ekspresiju gena za preprodinorfin (Hunter i sur, 1995). Također, pokazano je da ekspresija *c-fos*-a u kralježničnoj moždini ovisi o jakosti bolnog stimulusa. Tako će potentni bolni stimulusi inducirati dramatični porast transkripcije *c-fos*-a, a nastali c-Fos preko dimerizacije s Jun proteinima u AP-1 promovirati nastajanje dinorfina. Prema tome, nedvojbeno je uloga c-Fosa kao jedne od komponenti u regulaciji i modulaciji nocicepcije (Harris, 1998).

S obzirom da se radi o genu ranog odgovora, *c-fos* mRNA je aktivirana usko vezano uz podražaj i to vrlo brzo, svega nekoliko minuta nakon bolne stimulacije, a najveću aktivnost postiže nakon 30 do 60 minuta. Stoga je vrlo jednostavno precizirati lokaciju bolnim podražajem aktiviranih neurona. Međutim, ekspresija c-Fos je odgođena u odnosu na bolni stimulus. Maksimalne razine c-Fos proteina mogu se detektirati tek 1-3 h nakon stimulacije, a koncentracija u jezgri postepeno se smanjuje tijekom 4-6 h. Zbog takve odgode otežano je precizno i direktno povezivanje odgovornosti nekog događaja s genskom indukcijom te su mogući lažni pozitivni i lažni negativni rezultati. Lažni pozitivni rezultati smatraju se najvećim nedostatkom c-Fosa kao markera boli. Njegova ekspresija povezana je i sa stresom i uzbuđenosti te varira čak i ovisno o stanju budnosti životinje. Također, da bi razina ekspresije *c-fos*-a bila dovoljna za kvantifikaciju, podražaj mora biti izrazito jak i dugotrajan. Kako je podražajni prag za indukciju ekspresije *c-fos* varijabilan između pojedinih neurona, ponekad je teško uspoređivati neuronalnu aktivnost između različitih klasa neurona. U prilog c-Fos-u kao neuronalnom markeru boli govori činjenica da se njegova ekspresija događa isključivo u jezgri. Zahvaljujući tome razina c-Fos-a se može lako pratiti i kvantificirati imunohistokemijski te kombinirati s drugim tehnikama kojima se mogu ispitati svojstva označenog neurona. Nadalje, analizom broja c-Fos eksprimirajućih neurona u različitim uvjetima može se uspoređivati kakve posljedice na nocicepciju imaju različite manipulacije nociceptivnim sustavom. Za razliku od elektrofizioloških analitičkih tehnika, imunohistokemijska tehnika analize koja uključuje c-Fos ne zahtjeva anesteziranje ili dodatan

stres na životinje tijekom bolne stimulacije. Na taj način se minimizira utjecaj na ispitivane životinje i osiguravaju normalni uvjeti tijekom procesa nocicepcije (Gao i Ji, 2009; Harris, 1998; Barr, 2011).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Veliki broj pretkliničkih i kliničkih istraživanja proučava antinociceptivno djelovanje botulinum toksina. Pokazano je kako jednokratna lokalna primjena malih doza BT-A za posljedicu ima višemjesečno antinociceptivno djelovanje. Dugotrajnost učinka je njegova velika prednost nad ostalim trenutno dostupnim analgeticima (Bach-Rojecky, 2006).

BT-A pri niskim (nanomolarnim) dozama smanjuje patološku bolnu preosjetljivost, a nema utjecaja na akutne pragove boli. Pokazano je da je učinkovitost određene doze BT-A ovisna o mjestu primjene. Tako će nakon intratekalne primjene BT-A djelovati na perifernu bol (na mjestu prezeživanja *n. ishiadicusa*) pri nekoliko puta nižoj dozi u uspoređi sa subkutanom primjenom. Kako BT-A ne može prijeći krvno-moždanu barijeru i kako dosada nije pokazan njegov transport s periferije do supraspinalnih razina, smatramo da njegovo djelovanje ne uključuje više supraspinalne regije.

Za razliku od periferne i intratekalne primjene, u ispitivanjima na modelima visceralne (Drinovac i sur., 2014) i zrcalne boli (Drinovac i sur., 2016) u kojima je BT-A apliciran supraspinalno u cisternu magnu, antinociceptivni učinak je izostao. Rezultati istraživanja upućuju na središnje mjesto djelovanja, najvjerojatnije na razini dorzalnog roga kralježnične moždine gdje BT-A dolazi aksonalnim transportom s periferije. Budući da mehanizam djelovanja BT-A u središnjim sinapsama nije dovoljno razjašnjen potrebna su dodatna istraživanja.

U ovom diplomskom radu cilj je istražiti antinociceptivni učinak BT-A nakon njegove primjene u moždane komore na modelu formalinom izazvane upalne boli u štakora. Na uzorcima tkiva mozga koji obuhvaćaju talamus metodom imunohistokemije je analizirana aktivacija c-Fos-a kao markera aktivacije neurona, uslijed prethodne bolne stimulacije te pod utjecajem BT-A. Razjašnjenje mehanizma središnjeg djelovanja BT-A na supraspinalnoj razini doprinijelo bi daljnjem razvoju antinociceptivnog potencijala i primjene BT-A.

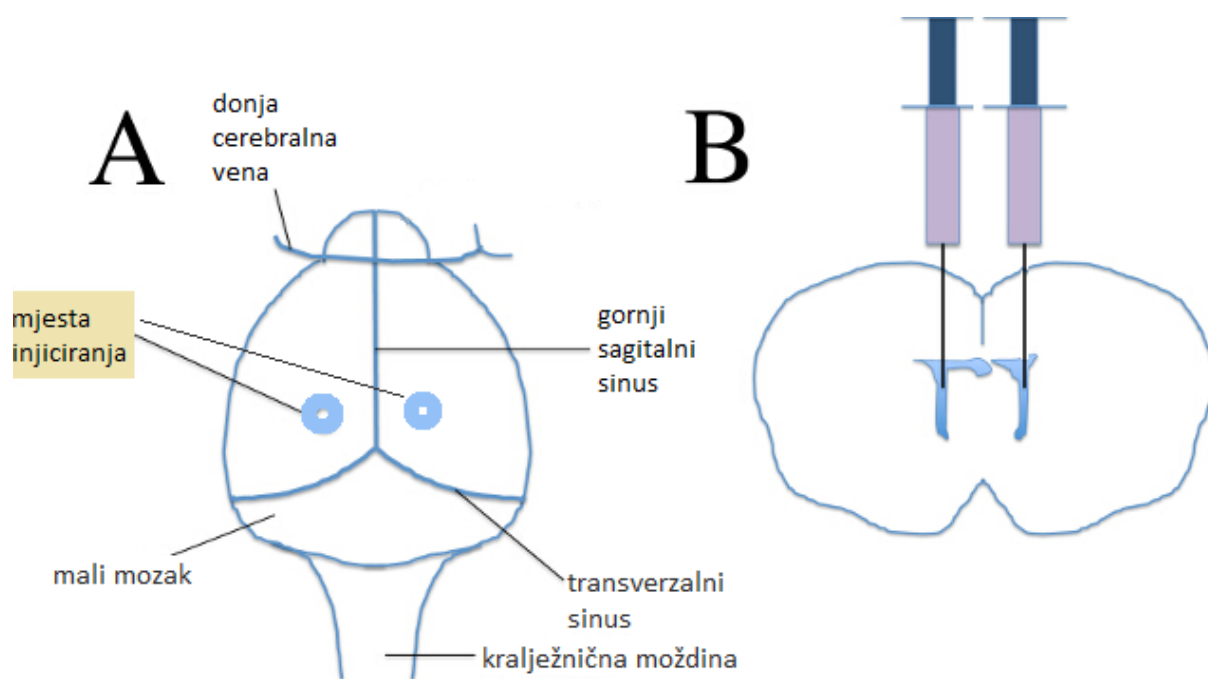
3. MATERIJALI I METODE

3.1. Životinjsko tkivo

U ovom diplomskom radu analizirani su uzorci poprečnih prereza mozga mužjaka štakora soja Wistar u dobi od 3 mjeseca, težine prosječno 350 g, uzgajanih na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Uzorke su pripremile osobe osposobljene za rad s pokusnim životinjama nakon provedenih bihevioralnih mjerenja. Pokusi na laboratorijskim životinjama izvedeni su u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja (NN 125/13) i smjernicama Međunarodne udruge za proučavanje boli (International Association for Study of Pain, IASP). Za obavljanje pokusa na projektima, kojih je ovaj diplomski rad dio, dobivena je dozvola Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.2. Ispitivana tvar: botulinum toksin tipa A

U pokusu je korišten BT-A (Botox[®], Allergan, SAD). Bočica komercijalnog pripravka Botox[®] sadrži 100 internacionalnih jedinica (i.j.) pročišćenog BT-A u obliku liofilizata. Jedna internacionalna jedinica odgovara količini toksina koja nakon i.p. primjene uzrokuje smrt 50 % miševa (LD50 = 0,048 ng = 1 i.j.). Kako bi se dobila potrebna doza, sadržaj bočice je otopljen u fiziološkoj otopini (0.9 % NaCl) i primijenjen u dozi od 1 i.j./kg i ukupnom volumenu od 5 µL u moždane komore (intracerebroventrikularno, i.c.v.) 5 dana prije izvođenja formalinskog testa (Slika 8).



Slika 8. Shematski prikaz mjesta injiciranja u lateralne moždane komore (prilagođeno prema https://www.jove.com/files/ftp_upload/54164/54164fig2large.jpg)

3.3. Kemikalije

50 μ L 5 %-tnog formalina injicirano je subkutano (s.c.) u plantarnu površinu stražnje desne šape štakora. Bol je praćena kao broj lizanja i trzanja šape u razdoblju od 60 min nakon injiciranja formalina.

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

U eksperimentu su životinje podijeljene u dvije skupine po 6 životinja. Jednoj je skupini 5 dana prije formalinskog testa i.c.v. injiciran BT-A, a drugoj, kontrolnoj skupini, fiziološka otopina u istom volumenu. Dva sata nakon injiciranja formalina po 3 životinje iz svake skupine su anestetizirane kloralhidratom (300 mg/kg) te su podvrgnute

transkardijalnoj perfuziji s paraformaldehidom radi uzimanja tkiva mozga za pripremu uzoraka potrebnih za imunohistokemijsku analizu.

3.5. Kemikalije

Za imunohistokemijsku analizu korištene su sljedeće kemikalije: paraformaldehid (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, SAD), Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, SAD), kozji serum (*normal goat serum*, NGS) (Vector, Inc., Burlingame, CA, SAD), primarno zečje poliklonsko protutijelo na c-Fos (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, SAD), sekundarno protutijelo Alexa Fluor-448 (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD) i medij za očuvanje fluorescencije Fluorogel (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, SAD).

3.6. Priprema tkiva za imunohistokemijsku analizu

Imunohistokemijska analiza obavljena je na uzorcima tkiva prikupljenih iz žrtvovanih životinja. Mozak je nakon žrtvovanja čuvan na temperaturi od 4 °C tijekom noći u 10 %-tnoj otopini sukroze u paraformaldehidu, potom idući dan u 30 %-tnoj otopini sukroze u fosfatnom puferu (eng. phosphate-buffered saline, PBS) te konačno smrznut na -80 °C do uporabe. Smrznuti uzorci izrezani su na kriostatu (Leica, Germany) na prereze debljine 30 µm. Dio diencefalona koji obuhvaća talamus podvrgnut je imunohistokemijskoj analizi.

3.7. Imunohistokemija

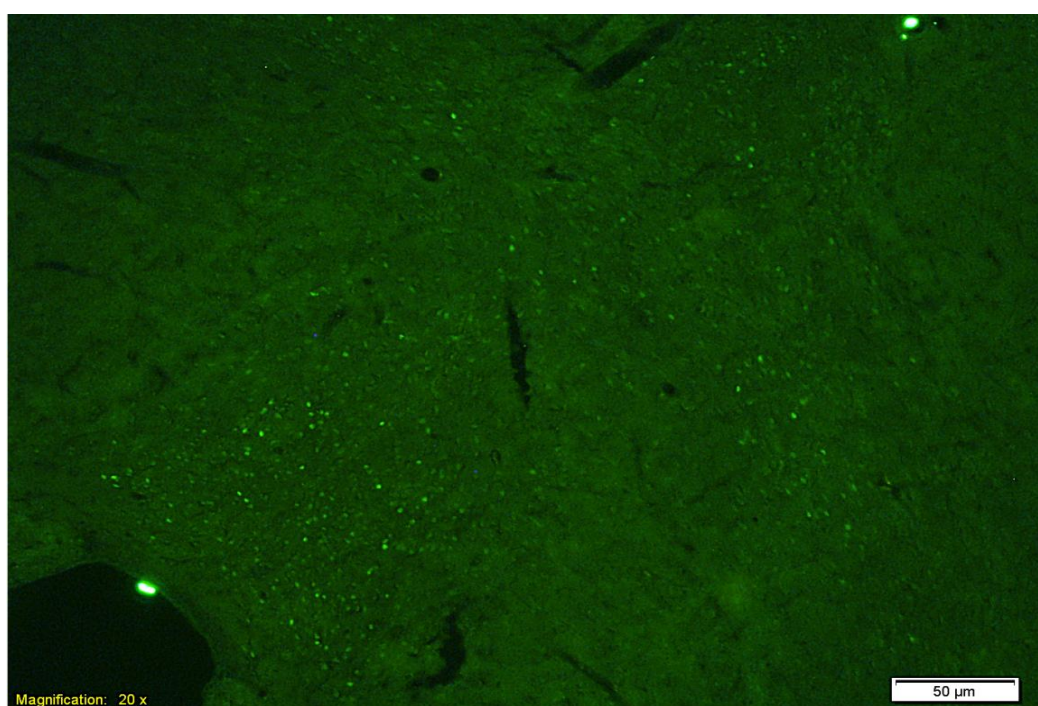
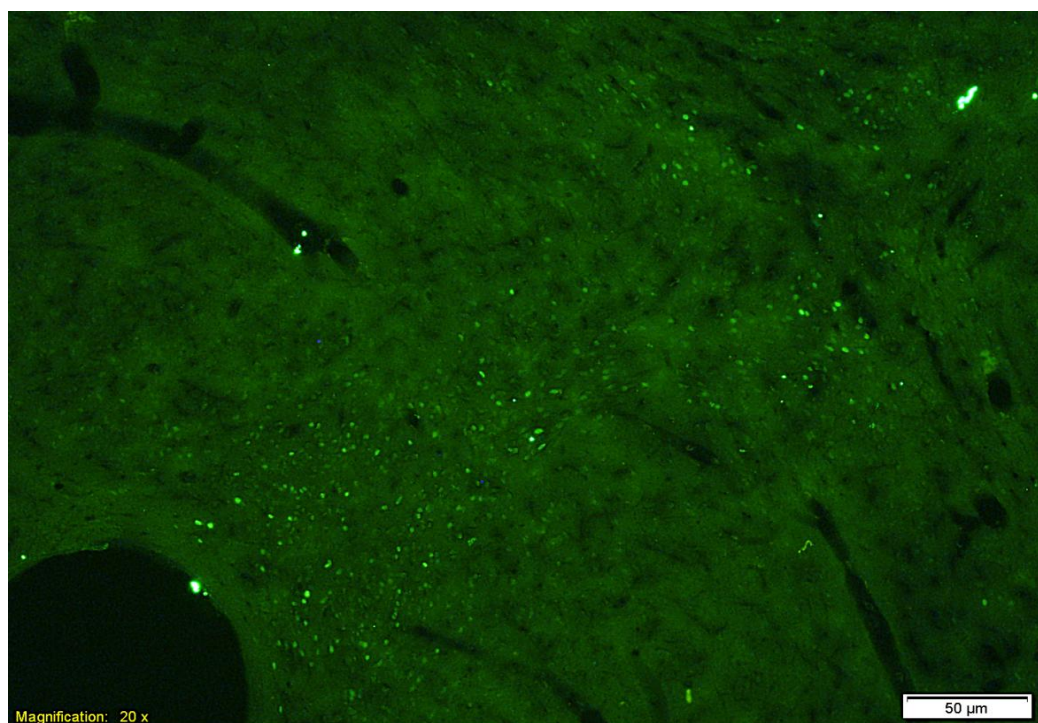
Odabrani prerezi stavljeni su u jažice s PBS-om. Uzorci su ispirani 3 puta po 5 minuta u 0,25 % otopini PBS – TritonX100 (PBST), blokirani 10 %-tnim kozjim serumom tijekom 1 h i inkubirani tijekom noći na sobnoj temperaturi sa zečjim anti-c-Fos primarnim protutijelom (1:500) razrijeđenim u 1 %-tnom kozjem serumu. Sljedeći dan su isprani 3 puta po 5 minuta PBST-om i inkubirani 2 h na sobnoj temperaturi u tami s fluorescentnim sekundarnim mišjim protutijelom Alexa Fluor-448 (1:400), razrijeđenim u 1 %-tnom kozjem serumu. Uzorci su opet isprani 3 puta po 5 minuta i potom nanoseni na predmetna stakalca. Prije stavljanja pokrovnice, na prereze je nanosena supstanca koja sprječava gubitak fluorescencije (Fluorogel). Prerezi su vizualizirani fluorescentnim mikroskopom (Olympus BX51, Olympus,

Tokyo, Japan) spojenim na digitalnu kameru (Olympus DP-70, Olympus, Tokyo, Japan) i fotografirani koristeći 10x i 40x povećanje. U programu PhotoScape prilagođeni su kontrast, oštrina i svjetlina fotografija pojedinih regija talamusa kako bi se lakše analizirali c-Fos pozitivni neuroni. C-Fos pozitivni neuroni prebrojani su u 3 nasumična prereza od svake životinje. Za svaku je životinju izračunata srednja vrijednost c-Fos pozitivnih neurona te je od srednjih vrijednosti za sve 3 životinje izračunata srednja vrijednost skupine.

3.8. Statistička analiza

Rezultati dobiveni u ovom ispitivanju prikazani su kao srednja vrijednost skupine \pm standardna pogreška aritmetičke sredine (SEM). Razlika varijanci analizirana je jednosmjernom analizom (One-way ANOVA) i Tukey HSD testom. Kao statistički značajna vrijednost uzeta je $p < 0.05$.

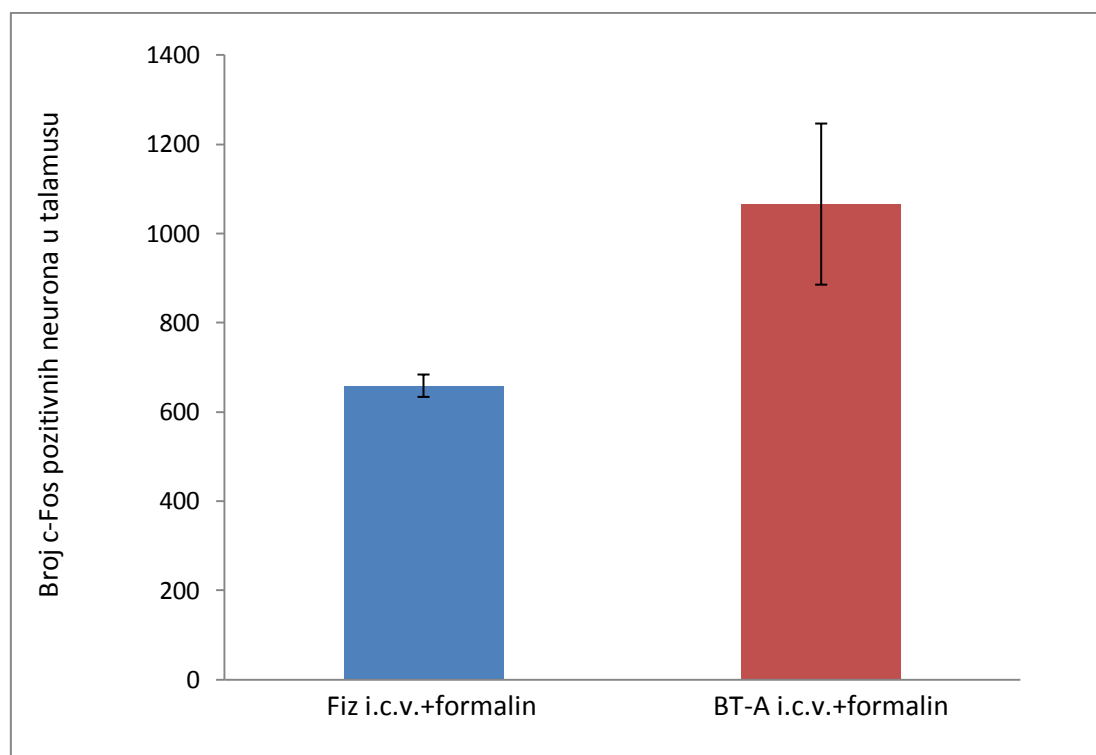
pojedine skupine, standardna devijacija i SEM prikazani su u tablici (Tablica 1) i grafički (Slika 11).



Slika 10. Prikaz imunoreaktivnosti c-Fos pozitivnih neurona u poprečnom presjeku mozga koji obuhvaća talamus u A) kontrolnoj i B) ispitivanoj skupini. Mjerilo: 50 μ m.

Tablica 1. Prikaz rezultata kvantitativne analize imunoreaktivnosti izračunatih kao srednja vrijednost \pm SEM. Utjecaj BT-A na aktivaciju neurona u talamusu promatran je kao broj c-Fos pozitivnih neurona.

Broj c-Fos pozitivnih neurona u A) kontrolnoj i B) ispitivanoj skupini		
Skupina	A) Kontrolna skupina (Fiziološka otopina i.c.v. + formalin)	B) Ispitivana skupina (BT-A i.c.v. + formalin)
Srednja vrijednost	658,6667	1065,667
Standardna devijacija (\pm)	143,4319	312,7448
SEM	25,07544	180,5633



Slika 11. Grafički prikaz rezultata kvantitativne analize imunoreaktivnosti. Utjecaj BT-A na aktivaciju neurona u talamusu promatran je kao broj c-Fos pozitivnih neurona, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost c-Fos pozitivnih neurona u talamusu \pm SEM.

Središnje porijeklo antinociceptivnog djelovanja BT-A pokazano je u nekoliko patofiziološki različitih eksperimentalnih modela boli i uslijed različitih načina primjene: periferno subkutano i središnje intratekalno (pregledni rad Matak i Lacković, 2014.). Pritom BT-A značajno smanjuje upalnu bol uzrokovanu formalinom, kao i bolnu preosjetljivost na mehanički podražaj u modelu periferne neuropatije, dijabetičke neuropatije, upalnog peritonitisa te zrcalne boli, nakon primjene u spinalni kanal u dozi od 1 i.j./kg, što je nekoliko puta niža doza od najmanje djelotvorne periferne doze (Bach-Rojecky, 2006.; Drinovac i sur., 2013.; Drinovac Vlah i sur., 2016.). Osim toga, antinociceptivni učinak nakon intratekalne primjene BT-A nastupa unutar 24 h, što je značajno brže u odnosu na perifernu primjenu, nakon koje se antinociceptivno djelovanje postiže tek za 5 dana (Bach-Rojecky, 2006.). Istraživanja pokazuju da je odgoda u antinociceptivnom djelovanju BT-A nakon periferne primjene najvjerojatnije posljedica putovanja toksina duž aksona do dorzalnog roga kralježnične moždine, gdje cijepajući svoj supstrat SNAP-25 smanjuje lučenje neurotransmitora uključenih u prijenos bolnog osjeta prema višim centrima u mozgu (pregledni rad Matak i Lacković, 2014.) uz moguću modulaciju aktivnosti inhibicijskih interneurona dorzalnog roga (Drinovac i sur., 2014.). No, budući da BT-A ne prolazi u središnji živčani sustav difuzijom, niti je do sada pokazan njegov transport putem neurona s periferije (nakon periferne primjene) ili putem neurona iz kralježnične moždine (nakon intratekalne primjene) do supraspinalnih regija, nije jasno imaju li supraspinalne regije ulogu u antinociceptivnom djelovanju BT-A, odnosno koje bi bilo točno mjesto antinociceptivnog djelovanja BT-A u središnjem živčanom sustavu. U cilju rasvjetljavanja navedenog pitanja, nedavno je istraženo djelovanje BT-A nakon primjene u cisternu magnu (i.c.) i moždane komore (i.c.v.). U modelu peritonisa (Drinovac i sur. 2014.), zrcalne boli uzrokovane intramuskularnom primjenom karagenana (Drinovac Vlah i sur., 2016.) i upalne boli uzrokovane formalinom (doktorat Drinovac Vlah, 2017.) BT-A primijenjen i.c. ili i.c.v. nije imao antinociceptivno djelovanje, dok je ista doza primijenjena u spinalni kanal smanjila bol u svim navedenim modelima. Ovi nalazi sugeriraju da bi antinociceptivno djelovanje BT-A na perifernu bol moglo biti segmentalno te da se odvija na razini kralježnične moždine.

Rezultati eksperimenta ovog rada na modelu formalinom uzrokovane upalne boli potvrđuju postavljenu hipotezu i nalaze bihevioralnog dijela istraživanja, pokazujući kako ekspresija c-Fos proteina u talamusu, ključnoj regiji mozga u kojoj završavaju različiti uzlazni putovi kojima se bolne informacije s periferije prenose do mozga i koja je zadužena za njihovu integraciju i obradu prije percepcije osjeta boli u korteksu, nije smanjena nakon supraspinalne (i.c.v.) primjene BT-A. Štoviše, kod nekih od životinja iz tretirane skupine brojčane

vrijednosti aktiviranih neurona bile su značajno više nego kod životinja kontrolne skupine, čak i kada se u obzir uzme standardna devijacija. Prema tome, tvar koja pokazuje analgetski učinak u bihevioralnim testovima nakon supraspinalne primjene, trebala bi smanjiti i c-Fos imunoreaktivnost, što ovdje svakako nije slučaj. Rezultati pokazuju da BT-A primijenjen i.c.v. ne smanjuje broj c-Fos pozitivnih neurona u talamusu, štoviše čak se vidi trend povećanja broja aktiviranih neurona.

Rezultati navedenih istraživanja i ovog diplomskog rada ukazuju na to da BT-A svoj centralni učinak ostvaruje na spinalnoj (kralježnična moždina), a ne supraspinalnoj razini.

5. ZAKLJUČAK

U ovom je diplomskom radu metodom imunohistokemije mjereno broj c-Fos pozitivnih neurona na poprečnim prerezima mozga štakora koji obuhvaćaju jezgre talamusa, regiji koja ima ulogu posrednika uzlaznih i silaznih bolnih putova s važnom ulogom u nocicepciji i modulaciji bolnih podražaja. Rezultati kvantifikacije c-Fos imunoreaktivnosti u talamusu su pokazali da periferno injiciranje formalina dovodi do aktivacije neurona u toj regiji mozga, što je u skladu s očekivanjima i rezultatima ranijih ispitivanja. Međutim, BT-A primijenjen u moždane komore nije smanjio broj c-Fos pozitivnih neurona, što bi inače bilo u skladu s djelovanjem tvari koja smanjuje bol na središnjoj razini. Stoga su ovi rezultati još jedan od dokaza koji potvrđuju hipotezu o segmentalnom antinociceptivnom djelovanju BT-A na razini kralježnične moždine i isključuju više centre, te dodatno doprinose rasvjetljavanju mjesta djelovanja BT-A u središnjem živčanom sustavu.

6. LITERATURA

Aoki KR. Evidence of Antnociceptive Activity of Botulinum Toxin Type A in Pain Management. *Headache*, 2003, 43(1), S9-S15.

Aoki KR. Review of a Proposed Mechanism for the Antinociceptive Action of Botulinum Toxin Type A. *Neurotoxicology*, 2015, 26, 785-93.

Aoki KR, Francis J. Updates on the antinociceptive mechanism hypothesis of botulinum toxin A. *Parkinsonism Relat Disord*, 2011, 17 (Suppl 1), 28-33.

Bach-Rojecky L. Antinociceptivno djelovanje botulinum toksina tipa A. Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2006, str. 5-31.

Bach-Rojecky L, Dominis M, Lacković Z. Lack of anti inflammatory effects of botulinum toxin 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.

Barash JR, Arnon SS. A Novel Strain of Clostridium botulinum That Produces Type B and Type H Botulinum Toxins. *J Infect Dis*, 2014, 209, 183-91.

Barr GA. Formalin-induced c-fos Expression in the Brain of Infant Rats. *J Pain*, 2011, 12(2), 263-271.

Bullock S, Hales M. Principles of Pathophysiology. Melbourne, Pearson Australia, 2013, str 248-265.

Cui, M., Khanijou, S., Rubino, J., Aoki, K.R., 2004. Subcutaneous administration of botulinum toxin A reduces formalin-induced pain. *Pain*, 107(1-2), 125-133.

Dhaked RK, Singh MK, Singh P, Gupta P. Botulinum toxin: bioweapon & magic drug. *Indian J Med Res*, 2010, 132, 489-503.

Drinovac V, Bach-Rojecky L, Babić A, Lacković Z. Antinociceptive effect of botulinum toxin type A on experimental abdominal pain. *Eur J Pharmacol*, 2014, 745, 190-5.

Drinovac V, Bach-Rojecky L, Babić A, Lacković Z. Association of antinociceptive action of botulinum toxin type A with GABA-A receptor. *J Neural Transm (Vienna)*, 2016, 121(6), 665-9.

Drinovac Vlah V., Bach-Rojecky L., Lacković Z. Antinociceptive action of botulinum toxin type A in carrageenan-induced mirror pain. *J Neural Transm (Vienna)*, 2016, 123(12), 1403-1413.

Drinovac Vlah V. Središnji neurotransmitori i mehanizam antinociceptivnog djelovanja botulinum toksina tipa A. Doktorski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2017.

Gao YJ, Ji RR. c-Fos and pERK, which is a better marker for neuronal activation and central sensitization after noxious stimulation and tissue injury?. *Open Pain J*, 2009, 2, 11-17.

Gazerani P, Staahl C, Drewes AM, Arendt-Nielsen L. The effects of botulinum toxin type A on capsaicin-evoked pain, flare, and secondary hyperalgesia in an experimental human model of trigeminal sensitization. *Pain*. 2006, 122, 315-32.

Giroto D, Bajek G, Ledić D, Stanković B, Vukas d, Kolbah B, Šimić H, Gavrančić A, Kolić Z. Patofiziologija bolnog puta. *Medicina Fluminensis*, 2012, 48, 271-277.

Glover JNM, Harrison SC. Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature*, 1995, 373(6511), 257-261.

Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2012, str 584-588.

Harris JA. Using c-fos as a Neural Marker of Pain. *Brain Res Bulletin*, 1998, 45(1), 1-8.

Hoffman GE, Smith MS, Verbalis JG. C-Fos and Related Immediate Early Gene Products as Markers of Activity in Neuroendocrine Systems. *Fron Neuroendocrinol*, 14, 1993, 14(3), 173-213.

Hunter JC, Woodburn, VL, Durieux C, Pettersson EK, Poat JA, Hughes J. c-fos antisense oligodeoxynucleotide increases formalin- induced nociception and regulates preprodynorphin expression. *Neuroscience*, 65, 1995(2), 485-492.

International Association for the Study of Pain. IASP taxonomy, 2012, <http://www.iasp-pain.org>, pristupljeno 13.6.2017.

Jabbari B. Botulinum Toxin Treatment of Pain Disorders, New York, Springer, 2015, str. 2-13.

Jankovic J. Botulinum toxin in clinical practice. *J Neurol, Neurosurg Psychiatry*, 2004, 75(7), 951-7.

Jin Y, Takegahara Y, Sugawara Y, Matsumura T, Fujinaga Y. Disruption of the epithelial barrier by botulinum haemagglutinin (HA) proteins- differences in cell tropism and the mechanism of action between HA proteins of types A or B and HA proteins of type C. *Microbiology*, 2009, 155 (Pt 1), 35-45.

Karadža V, Majerić-Kogler V, Perić M, Popović Lj, Šakić K, Vegar-Brozović V. Klinička anesteziologija i reanimatologija. Katedra za anesteziologiju i reanimatologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2005, str. 175-180.

Katzung BG, Trevor AJ. Basic and Clinical Pharmacology. New York, Lange, 2015, str. 82-84.

- Kidd BI, Urban LA. Mechanisms of inflammatory pain. *Br Anesth*, 2001, 87(1), 3-11.
- Kim DW, Lee SK, Ahnn J. Botulinum Toxin as a Pain killer: Players and Actions in Antinociception. *Toxins*, 2015, 7(7), 2435-2453.
- Kovács KJ. C-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem Int*, 1998, 33(4), 287-297.
- Kumar R, Dhaliwal HP, Kukreja RV, Singh BR. The Botulinum Toxin as a Therapeutic Agent: Molecular Structure and Mechanism of Action in Motor and Sensory Systems. *Semin Neurol*, 2016, 36, 10-19.
- Lee K, Gu S, Jin L, Le TT, Cheng LW, Strotmeier J, Kruel AM, Yao G, Perry K, Rummel A, Jin R. Structure of a bimodular botulinum neurotoxin complex provides insights into its oral toxicity. *PLoS Pathog*, 2013, 9(10).
- Luvisetto S, Marinelli S, Lucchetti F, Marchi F, Cobianchi S, Rossetto O, Montecucco C, Pavone F. Botulinum neurotoxins and formalin-induced pain: central vs. peripheral effects in mice. *Brain Res*, 2006, 1082, 124-31.
- Matak I, Lacković Z. Botulinum toxin A, brain and pain. *Prog Neurobiol*, 2014, 17, 39-59.
- Milan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*, 1999, 1-164.
- Nigam PK, Nigam A. Botulinum toxin. *Indian J Dermatolog*, 2010, 55(1), 8-14.
- Ohishi I, Iwasaki M, Sakaguchi G. Vascular permeability activity of botulinum C2 toxin elicited by cooperation of two dissimilar protein components. *Infect Immun*, 1981, 31(3), 890-5.
- Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* 5th Edition, Cambridge, Academic Press, 2004, Figure 53.

Piechaczyk M, Blanchard JM. C-fos proto-oncogene regulation and function. *Crit Rev Oncology Hematol*, 1994, 17(2), 93-131.

Puljak L, Sapunar D. Fenomen boli- anatomija, fiziologija, podjela boli. *Medicus* 2014, 23, 7-13.

Said SZ, Meshkinpour A, Carruthers A, Charruters J. Botulinum Toxin A Its Expanding Role in Dermatology and Esthetics. *Am J Clini Dermatol*, 2003, 4(9), 609-16.

Sažetak opisa svojstava lijeka (Botox 50 Allergan) 2017., www.halmed.hr, pristupljeno 10.6.2017.

Sim WS. Application of Botulinum Toxin in Pain Management. *Korean J Pain*, 2011, 24(1), 1-6.

Simpson LL. Identification of the Major Steps in Botulinum Toxin Action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2004, 44, 167-93.

OTC Pain Advisor, 2010, <http://jpa.org.jo/>, pristupljeno 20.6.2017.

Sluka KA, Kalra A, Moore SA. Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. *Muscle Nerve*, 2001, 24, 37-46.

Sobel J. Botulism. *Clinl Infect Dis*. 2005, 41(8), 1167-73.

Szalóki N, Krieger JW, Komáromi I, Tóth K, Vámosi G. Evidence for Homodimerization of the c-Fos Transcription Factor in Live Cells Revealed by Fluorescence Microscopy and Computer Modeling. *Mol Cel Biol*, 2015, 35(21), 3785-98.

Timbrell JA. Principles of Biochemical Toxicology. New York, Informa Healthcare USA, 2009, str. 352-354.

Truong DD, Jost WH. Botulinum toxin: Clinical use. *Parkinsonism Relat Disord*, 2006, 12 (6), 331-55.

Turton K, Chaddock JA, Acharya KR. Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. *Trends Biochem Sci*, 2002, 27(11), 552-558.

Tugnoli V, Capone JG, Eleopra R, Quatralo R, Sensi M, Gastaldo E, et al. Botulinum toxin type A reduces capsaicin-evoked pain and neurogenic vasodilatation in human skin. *Pain*, 2007, 130(1-2), 76-83.

WHO analgesic ladder, 2015, <http://www.paineurope.com>, pristupljeno 20.6.2017.

WHO guidelines on persisting pain in children, 2012, <http://www.who.int/medicines>, pristupljeno 18.6.2017.

WHO Botulism Fact Sheet, 2016, <http://www.who.in/>, pristupljeno 18.6.2017.

7. SAŽETAK

Kliničkim i pretkliničkim studijama pokazano je da jednokratno lokalno primijenjen BT-A smanjuje bol tijekom nekoliko mjeseci, što se smatra velikom prednosti u odnosu na danas dostupne analgetike. Brojnim eksperimentalnim istraživanja na animalnim i ljudskim modelima boli potvrđen je analgetski učinak BT-A. Međutim, za razliku od poznatog miorelaksirajućeg mehanizma djelovanja, mehanizam djelovanja botulinum toksina na bol još uvijek je nepoznat.

Novija ispitivanja vode prema zaključcima da BT-A antinociceptivno djeluje na razini središnjeg živčanog sustava, a ne periferno kako se ranije smatralo. Prema tome, cilj ovog rada bio je odrediti mjesto centralnog djelovanja botulinum toksina praćenjem aktivacije c-Fos proteina kao prihvaćenog markera aktivacije neurona uslijed boli. Hipoteza rada je bila da BT-A analgetski učinak ostvaruje na spinalnoj razini.

Ispitivanja su provedena na tkivu mozga mužjaka štakora soja Wistar kojima je prethodno uzrokovana bol formalinom. BT-A je primijenjen u moždane komore (i.c.v.) u dozi od 1 i.j./kg. Kontrolnoj skupini je umjesto BT-A i.c.v. primijenjena fiziološka otopina (0,9 % NaCl). Rezultati kvantifikacije c-Fos imunoreaktivnosti u talamusu su pokazali da periferno injiciranje formalina dovodi do aktivacije neurona u toj regiji mozga, što je u skladu s očekivanjima i rezultatima ranijih ispitivanja. Međutim, BT-A primijenjen u moždane komore nije smanjio broj c-Fos pozitivnih neurona. Ovi rezultati su još jedan od dokaza koji potvrđuju hipotezu o segmentalnom antinociceptivnom djelovanju BT-A na razini kralježnične moždine i isključuju više centre, te dodatno doprinose rasvjetljavanju mjesta djelovanja BT-A u središnjem živčanom sustavu.

SUMMARY

Clinical and preclinical trials have shown that BT-A decreases pain for several months after single local injection, which is a big advantage in comparison to today available analgetics. Numerous research on animal and human pain models have confirmed these findings. Unlike relatively established myorelaxant mechanism of botulinum toxin, antinociceptive mechanism still remains unknown.

Novel research conclude that the antinociceptive effects of botulinum toxin are of central and not, as it was earlier considered, peripheral origin. The goal of this experiment was to establish the exact location of BT-A activity in central nervous system. Hypothesis is that BT-A accomplishes analgetic effects on spinal level.

Male Wistar rats were injected i.c.v. with BT-A (1 i.u./kg). The control group rats were injected i.c.v. with physiological saline (0,9 % NaCl) instead of BT-A. The animals were sacrificed after the formalin test and the brain samples were collected, processed and used for immunohistochemical analysis. The results for experimental and control group were obtained after counting the number of c-Fos positive neurons. The average number of c-Fos positive neurons was greater for the control group. Based on the results it is concluded that BT-A fails to show effectiveness after i.c.v. application and that the analgetic effect is of spinal, and not supraspinal origin.

Further research is needed to investigate mechanism of BT-A antinociceptive activity in spinal cord.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

UTJECAJ BOTULINUM TOKSINA TIP A NA AKTIVACIJU NEURONA U TALAMUSU U MODELU UPALNE BOLI

Ena Bulović

SAŽETAK

Kliničkim i pretkliničkim studijama pokazano je da jednokratno lokalno primijenjen BT-A smanjuje bol tijekom nekoliko mjeseci, što se smatra velikom prednosti u odnosu na danas dostupne analgetike. Brojnim eksperimentalnim istraživanjima na animalnim i ljudskim modelima boli potvrđen je analgetski učinak BT-A. Međutim, za razliku od poznatog miorelaksirajućeg mehanizma djelovanja, mehanizam djelovanja botulinum toksina na bol još uvijek je nepoznat.

Novija ispitivanja vode prema zaključcima da BT-A antinociceptivno djeluje na razini središnjeg živčanog sustava, a ne periferno kako se ranije smatralo. Prema tome, cilj ovog rada bio je odrediti mjesto centralnog djelovanja botulinum toksina praćenjem aktivacije c-Fos proteina kao prihvaćenog markera aktivacije neurona uslijed boli. Hipoteza rada je bila da BT-A analgetski učinak ostvaruje na spinalnoj razini. Ispitivanja su provedena na tkivu mozga mužjaka štakora soja Wistar kojima je prethodno uzrokovana bol formalinom. BT-A je primijenjen u moždane komore (i.c.v.) u dozi od 1 i.j./kg. Kontrolnoj skupini je umjesto BT-A i.c.v. primijenjena fiziološka otopina (0,9 % NaCl). Rezultati kvantifikacije c-Fos imunoreaktivnosti u talamusu su pokazali da periferno injiciranje formalina dovodi do aktivacije neurona u toj regiji mozga, što je u skladu s očekivanjima i rezultatima ranijih ispitivanja. Međutim, BT-A primijenjen u moždane komore nije smanjio broj c-Fos pozitivnih neurona. Ovi rezultati su još jedan od dokaza koji potvrđuju hipotezu o segmentalnom antinociceptivnom djelovanju BT-A na razini kralježnične moždine i isključuju više centre, te dodatno doprinose rasvjetljavanju mjesta djelovanja BT-A u središnjem živčanom sustavu.

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

Rad sadrži: 36 stranica, 11 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 56 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: botulinum toksin, bol, c-Fos, formalinski test, imunohistokemija

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Višnja Drinovac Vlah, *viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko*
Dr. sc. Ivan Pepić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko*

Rad prihvaćen: rujan 2017.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

THE EFFECT OF BOTULINUM TOXIN TYPE A ON C-FOS ACTIVATION IN THALAMUS IN INFLAMMATORY PAIN MODEL

Ena Bulović

SUMMARY

Clinical and preclinical trials have shown that BT-A decreases pain for several months after single local injection, which is a big advantage in comparison to today available analgetics. Numerous research on animal and human pain models have confirmed these findings. Unlike relatively established myorelaxant mechanism of botulinum toxin, antinociceptive mechanism still remains unknown.

Novel research conclude that the antinociceptive effects of botulinum toxin are of central and not, as it was earlier considered, peripheral origin. The goal of this experiment was to establish the exact location of BT-A activity in central nervous system. Hypothesis is that BT-A accomplishes analgetic effects on spinal level.

Male Wistar rats were injected i.c.v. with BT-A (1 i.u./kg). The control group rats were injected i.c.v. with physiological saline (0,9 % NaCl) instead of BT-A. The animals were sacrificed after the formalin test and the brain samples were collected, processed and used for immunohistochemical analysis. The results for experimental and control group were obtained after counting the number of c-Fos positive neurons. The average number of c-Fos positive neurons was greater for the control group. Based on the results it is concluded that BT-A fails to show effectiveness after i.c.v. application and that the analgetic effect is of spinal, and not supraspinal origin.

Further research is needed to investigate mechanism of BT-A antinociceptive activity in spinal cord.

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

Thesis includes: 36 pages, 11 figures, 1 table and 56 references. Original is in Croatian language.

Keywords: botulinum toxin, pain, c-Fos, formalin test, immunohistochemistry

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
Višnja Drinovac Vlah, Ph.D. Senior Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ivan Pepić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2017.