Središnje antinociceptivno djelovanje botulinum toksina a: uloga glutamatnog sustava

Janjanin, Bojana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:163:290581

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Bojana Janjanin

SREDIŠNJE ANTINOCICEPTIVNO DJELOVANJE BOTULINUM TOKSINA TIPA A: ULOGA GLUTAMATNOG SUSTAVA?

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Farmakologija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmakologiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta pod vodstvom poslijedoktorandice dr. sc. Višnje Drinovac Vlah.

Zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Višnji Drinovac Vlah, poslijedoktorandici Zavoda za farmakologiju na prenesenom znanju, zanimljivom iskustvu, strpljenju te nesebičnoj i prijateljskoj pomoći u svakom trenutku. Srdačno zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda na pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada, a posebice gđi Danici na svakodnevnom osmijehu i ugodnom društvu.

Najveće hvala mojoj obitelji, prijateljima i Mirku na razumijevanju, motivaciji i bezuvjetnoj podršci.
Posebno hvala mojim roditeljima na požrtvovanom životu koji je omogućio ovakve trenutke mojoj braći i meni.

Sadržaj

1. UVOD **1**

1.1. BOL 1

1.1.1. RECEPTORI ZA BOL I NOCICEPCIJSKI PUTOVI 1

1.1.2. DORZALNI ROG KRALJEŠNIČNE MOŽDINE 3

1.1.3. MEHANIZMI PERIFERNE I CENTRALNE SENZITIZACIJE 4

1.1.4. GLUTAMATNI RECEPTORI 7

1.1.5. PSD-95 7

1.1.6. TERAPIJA BOLI 8

1.2. BOTULINUM TOKSIN TIPA A 8

1.2.1. STRUKTURA I MEHANIZAM DJELOVANJA BOTULINUM TOKSINA TIPA A .8

1.2.2.KLINIČKA PRIMJENA BT-A 10

1.2.3. ANALGETSKI UČINAK BT-A 11

2. OBRAZLOŽENJE TEME **13**

3. MATERIJALI I METODE **14**

3.1. UZORCI TKIVA 14

3.2. ISPITIVANE TVARI 14

3.3. KEMIKALIJE I REAGENSI 15

3.4. EKSPERIMENTALNI PROTOKOLI 17

3.4.1. Bihevioralni dio pokusa: formalinski test 17

3.4.2. WESTERN BLOT ANALIZA 17

4. REZULTATI I RASPRAVA **20**

5. ZAKLJUČAK **25**

6. LITERATURA **26**

7. SAŽETAK **30**

1. UVOD

1.1. BOL

Prema Međunarodnoj udruzi za istraživanje boli (IASP), bol je neugodno senzorno i emocionalno iskustvo vezano uz stvarnu ili moguću ozljedu tkiva. Bol možemo podijeliti na nekoliko različitih načina, što nam je važno za što učinkovitiju terapiju i smanjenje patnje pacijenata.

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji, najčešći klasifikacijski sustavi boli jesu:

A) anatomski: opisuje specifično područje tijela zahvaćeno boli. U praksi je to najčešće prvi sustav klasifikacije boli koji se ispituje. Često je pitanje: „Gdje Vas boli?"

B) etiološki: opisuje uzrok boli, što može biti akutna ozljeda ili osnovna bolest ili stanje. Potpodjela ove klasifikacije uključuje maligne i nemaligne uzroke boli.

C) prema intenzitetu: opisuje jačinu boli, a klasificira se prema vizualnim, numeričkim ili opisnim skalama intenziteta boli.

D) prema trajanju: opisuje period u kojem pacijent osjeća bol. Osnovni klasifikacijski sustav obuhvaća podjelu na akutnu i kroničnu bol, a neki uvrštavaju i treću, epizodnu bol. Akutna bol predstavlja kratkotrajnu bol koja prolazi kroz tri mjeseca. Često je povezana s akutnom ozljedom ili traumom i služi kao zaštitni mehanizam. Kronična je bol kontinuirana bol koja traje dulje od tri mjeseca te utječe negativno na kvalitetu života.

E) patofiziološki: temelji se na patofiziološkom mehanizmu ozljede te dijeli bol na nociceptivnu i neuropatsku. Nociceptivna je bol normalan odgovor tijela na ozljedu te nastaje aktivacijom receptora za bol u koži i mišićima (somatska bol) ili unutarnjim organima (visceralna bol) te može rezultirati i oštećenjem samog tkiva. Neuropatska bol nastaje oštećenjem perifernog ili središnjeg živčanog sustava te je uzrokovana nastankom ektopične spontane aktivnosti na mjestu oštećenja, a ne na perifernim nociceptorima. Neuropatsku bol možemo podijeliti na simpatički posredovanu, perifernu i centralnu (Orr i sur., 2017).

1.1.1. RECEPTORI ZA BOL I NOCICEPCIJSKI PUTOVI

Nocicepcijski putovi formiraju kompleksan i dinamičan senzorni, kognitivni i bihevioralni sustav koji se razvio kako bi detektirao, integrirao i koordinirao zaštitni odgovor

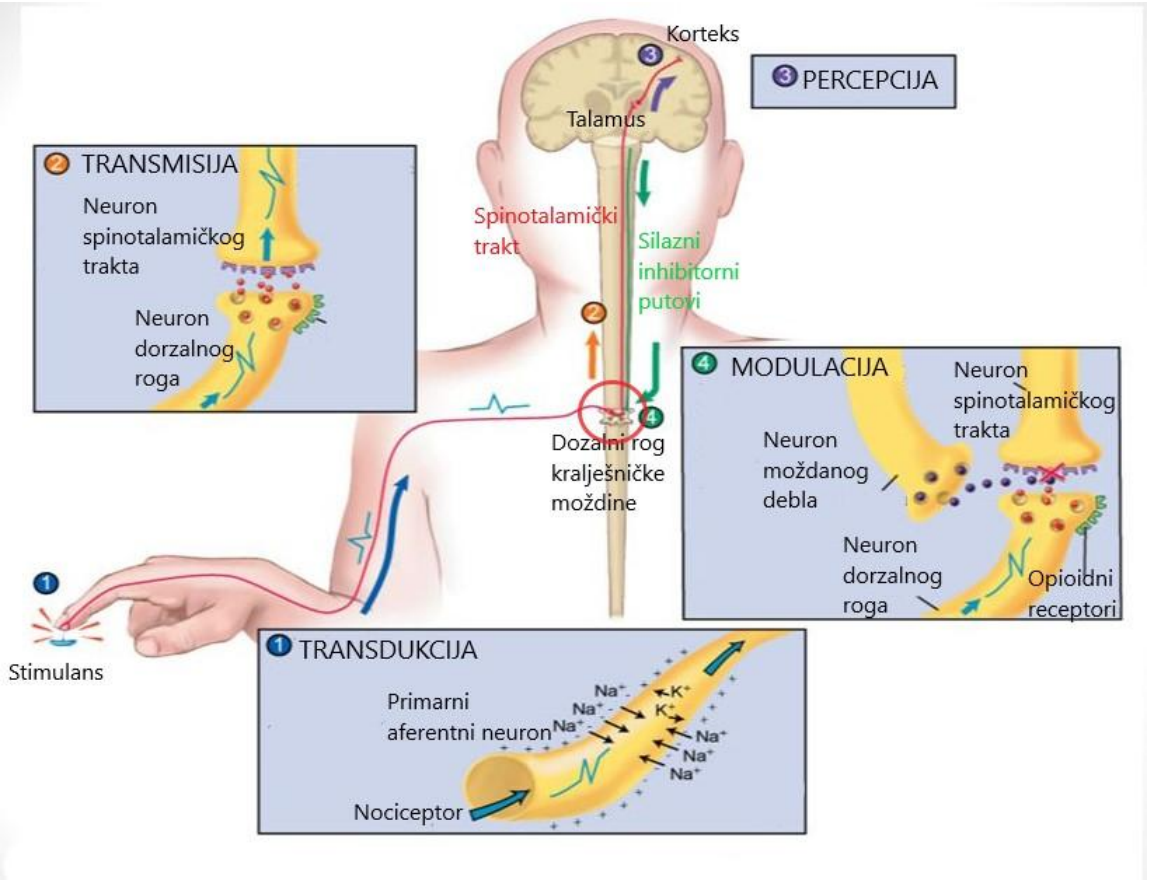
za očuvanje tkiva te u konačnici preživljenje organizma. Iako su mnoge osnovne strukture nocicepcijskih putova definirane, još uvijek ne razumijemo u potpunosti njihove međusobne interakcije koje bi omogućile razvoj ciljanih terapija (Bourne i sur., 2014).

Receptori za bol (nocireceptori) slobodni su živčani završeci u perifernim tkivima koji se pri fiziološkim uvjetima aktiviraju tek podražajima visokog intenziteta, a za razliku od ostalih osjetnih receptora, nemaju svojstvo prilagodbe na podražaj (desentizacije). Štoviše, uslijed ponavljanja podražaja njihova se osjetljivost povećava, odnosno dolazi do sentizacije. Nociceptori se nalaze na perifernim završecima mijeliniziranih Aδ i nemijeliniziranih C živčanih vlakana. Prema tome ih dijelimo u dvije osnovne skupine:

- Aδ-nociceptore, koje podražuje mehanička stimulacija (poput ubadanja i gnječenja), zbog čega se nazivaju mehanosenzitivnima
- C-nocicepore, koji reagiraju na mehaničke, termalne i kemijske podražaje te ih stoga nazivamo polimodalnima. Postoje i tzv. tihi nociceptori koji se aktiviraju uslijed ozljede u stanju periferne senzitizacije (Drinovac Vlah, 2017).

Nociceptivna bol sastoji se od četiriju faza (slika 1): trandukcije (aktivnost na receptorima na periferiji), transmisije (akcijski potencijal na aksonima), percepcije (kortikalna obrada nocicepcijskog ulaza) i modulacije (angažman silaznih puteva). Nakon izlaganja bolnom podražaju slobodni živčani završetak Aδ ili C primarnog aferentnog neurona kože ili visceralnih tkiva (nociceptor) pretvara termalni, mehanički ili kemijski podražaj u električni impuls koji se prenosi u dorzalni rog kralješnične moždine. Nociceptivna informacija modulira se u dorzalnom rogu, lokalnim spinalnim putovima te supraspinalnim silaznim putovima iz mozga koji mogu inhibirati ili olakšavati (facilitirati) prijenos informacije u mozak, završno mjesto nocicepcijskog puta, gdje se bolni podražaj prevodi u svjesnu percepciju boli (Fernandes i sur., 2018).

Općenito se smatra da patološka bol ima izvor u izmijenjenoj neuronalnoj aktivnosti, tj. neuralnoj plastičnosti. Ova promijenjena aktivost uključuje senzitizaciju perifernih primarnih senzornih neurona u dorzalnom korijenu ganglija i trigeminalnom gangliju te senzitizaciji centralnih nociceptivnih neurona kralješnične moždine, trigeminalne jezgre, moždanog debla i kore. Ove promjene u perifernom živčanom sustavu, poznate kao periferna senzitizacija, i središnjem živčanom sustavu, poznate kao središnja senzitizacija, znače da osoba ima povećanu percepciju boli (Ji i sur., 2014).



Slika 1. Prikaz širenja bolnog podražaja s periferije (mjesta ozljede) do središnjeg živčanog sustava (modificirano iz Sounders 2013, *Wall & Melzack's Textbook of Pain*).

1.1.2. DORZALNI ROG KRALJEŠNIČNE MOŽDINE

Dorzalni rog kralješnične moždine mjesto je na kojemu se odvija prijenos (transmisija) bolne informacije u SŽS te je podložno razvoju različitih patoloških promjena. Proces transmisije odvija se u sinapsama pomoću različitih kemijskih posrednika: neurotransmitora i neuropeptida. Ovaj prijenos može biti monosinaptički (izravan, uključuje prijenos informacije s perifernog neurona na drugi neuron u osjetnom putu) ili polisinaptički (u prijenos bolne informacije uključeni su interneuroni) (Drinovac Vlah, 2017).

U dorzalnom rogu nalaze se četiri važne neuronalne komponente koje ulaze u složene interakcije (Prescott i sur., 2014). To su:

1. središnji završeci primarnih aferentnih neurona koji ulaze u različita područja dorzalnog roga (ovisno o vrsti primarnog aferentnog vlakna)

2. intrinzični neuroni (interneuroni), čiji su aksoni kratki, tj. ostaju u kralješničnoj moždini ili lokalno ili se šire u druge spinalne segmente
3. projekcijski neuroni (neuroni drugog reda), čiji aksoni prolaze rostralno u područje bijele tvari te ulaznim putovima dolaze do različitih regija mozga
4. završeci aksona silaznih putova iz nekoliko regija mozga.

Prema tome, dorzalni rog kralješnične moždine prima raznolike senzorne informacije koje stižu iz unutarnjeg i vanjskog okoliša te modularne inpute iz supraspinalnih centara. Ova informacija obrađuje se u dorzalnom rogu prije nego što se prosljeđuje prema mozgu gdje može dovesti do percepcije boli. Spinalna integracija ove informacije temelji se na međuodnosu različitih neurona dorzalnog roga koji formiraju kompleksne i plastične neuralne mreže (Cordero-Erausquin i sur., 2016).

1.1.3. MEHANIZMI PERIFERNE I CENTRALNE SENZITIZACIJE

Periferna senzitizacija predstavlja smanjenje praga aktivacije receptora i ionskih kanala i/ili pojačanog odgovora na perifernim završecima senzornih živčanih vlakana zbog djelovanja kemijskih medijatora otpuštenih iz nociceptora ili ne-neuralnih stanica poput mastocita, bazofila, makrofaga i neutrofila na mjestu ozljede tkiva ili upale. Brojne su signalne molekule uključene u perifernu senzitizaciju od kojih neke aktiviraju nociceptore (poput ATP-a i kalijevih iona, koji se otpuštaju iz oštećenog tkiva), a neke ih senzitiziraju (poput prostagladina). Molekularni mehanizam periferne senzitizacije posredovan je metabotropnim receptorima spregnutim s G-proteinima na membranama perifernih aferentnih završetaka te aktivacijom protein kinaza A i C (PKA, PKC) koje fosforiliraju ionske kanale i receptore. Time se smanjuju pragovi za njihovu aktivaciju, a podražljivost membrane nociceptora povećava se. Posljedično sve više signala ulazi u dorzalni rog kralješnične moždine te povećava lučenje glutamata. U akutnoj nocicepcijskoj boli učinak glutamata preko AMPA receptora depolarizira projekcijski neuron omogućujući brzi prijenos bolne informacije. U ovom slučaju nije moguće aktivirati NMDA receptor jer je u fiziološkim uvjetima blokiran Mg^{2+} ionima. Međutim, u slučaju učestale stimulacije nocicepcijskih C vlakana, uz glutamat se luče i neuropeptidi poput SP-a, neurokinina A i CGRP-a. Vežući se za postsinaptičke receptore, uzrokuju kumulativnu depolarizaciju projekcijskih neurona, što uklanja blokadu NMDA receptora i omogućuje prolaz Ca^{2+} ionima. Porast unutarstanične razine Ca^{2+} u projekcijskom neuronu dorzalnog roga utokom kroz NMDA receptor smatra se

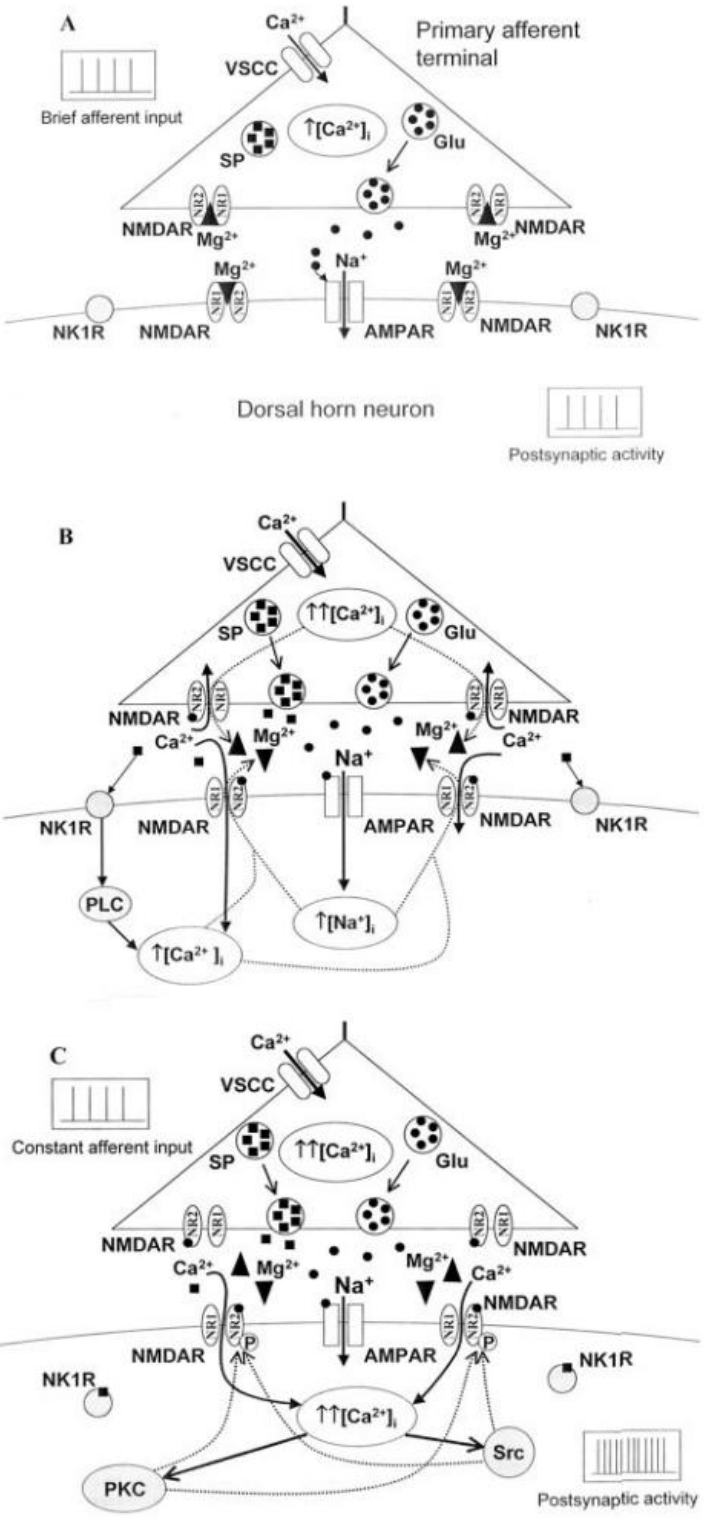
ključnim pokretačem središnje senzitizacije. Ca^{2+} aktivira unutarstanične kinaze dovodeći do fosforilacije NMDA i AMPA receptora, što povećava aktivnost i membransku gustoću ovih receptora te konačno uzrokuje postsinaptičku hiperpodražljivost. Osim toga, posljedica aktivacije protein kinaza jest i aktivacija neuronalne NO sintaze i stvaranje NO koji djeluje kao retrogradni glasnik: difuzijom u presinaptički završetak doprinosi daljnjem lučenju glutamata. Nakon ovih ranih promjena koje dovode do promjena u distribuciji i funkciji postojećih proteina u središnjim se neuronima događaju promjene u genskoj regulaciji, posljedica čega je sinteza novih proteina. Ove promjene, koje uzrokuju porast podražljivosti neurona dorzalnog roga kraljšnične moždine, nazivamo centralnom senzitizacijom (Drinovac Vlah, 2017). Senzitizacija je važna u procesu cijeljenja pri oštećenju tkiva, ali je i ključni dio zbivanja pri razvijanju 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).

Slika 2 prikazuje ulogu NMDA receptora u središnjoj senzitizaciji:

A) Normalna sinaptička transmisija: NMDA receptori ne sudjeluju u normalnoj sinaptičkoj transmisiji zbog njihovog o naponu ovisnog bloka izazvanog izvanstaničnim ionima magnezija.

B) Postsinaptička depolarizacija i uklanjanje magnezijskog bloka NMDA receptora: Konstantni priljev signala nakon ozljede tkiva depolarizira membranu dovoljno jako da omogući sudjelovanje NMDA receptora u sinaptičkoj transmisiji. Nociceptivni signal koji ide prema dorzalnom rogu dodatno se pojačava pozitivnim odgovorom presinaptičkih NMDA receptora.

C) Posttranslacijske promjene NMDA receptora: Ulaz kalcijevih iona uzrokuje aktivaciju proteinskih kinaza te rezultira fosforilacijom NMDA receptora. Posljedično, magnezijski se blok smanjuje i produljuje vrijeme otvorenosti ionskih kanala.



Slika 2. Shematski prikaz uloge NMDA receptora u centralnoj senzitizaciji (prilagođeno prema Petrenko i sur., 2003). *Kratice:* AMPAR=*α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxasolepropionic acid receptor*; NK1R= *neurokinin 1 receptor*; NMDAR=*N-methyl-d-aspartate receptor*; VSCC= *voltage-sensitive calcium channel*; Glu= *glutamate*; SP= *substance* P; PLC = *phospholipase C*; PKC= *protein kinase C*; Src = *protein tyrosine kinase*; P = *phosphate group.)*

1.1.4. GLUTAMATNI RECEPTORI

U prijenosu bolne informacije u nocicepijskom putu sudjeluju brojni neurotransmitori i neuropeptidi, među kojima je glavni glutamat. Glutamat djeluje putem dviju skupina receptora: ionotropnih i metabotropnih glutamatnih receptora (Das, 2015). Ionotropni glutamatni receptori (iGluR) formiraju ionski kanal koji se aktivira kada se glutamat veže za receptor. Ionotropne glutamatne receptore dijelimo na NMDA (N-metil-D-aspartat), AMPA (α-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kiselina) i kainatne receptore. NMDA receptori su složeni kao heteromeri koji se sastoje od GluN1, GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D, GluN3A i GluN3B podjedinica. Funkcionalne studije NMDA receptora u senzornom sustavu uglavnom se fokusiraju na GluN1, GluN2A i GluN2B podjedinice. NMDA receptori imaju visoku propusnost za Ca^{2+}, a blokiraju ih Mg^{2+}. AMPA receptori su homomeri ili heteromeri koji se sastoje od GluA1, GluA2, GluA3 i GluA4 podjedinica. Kainatni receptori mogu biti homomeri ili heteromeri koji se sastoje od GluK1 (GluR5), GluK2 (GluR6) ili GluK3 podjedinica. Općenito, AMPA receptori uglavnom pridonose sinaptičkoj transmisiji i plastičnosti potaknutoj različitim mehanizmima, dok NMDA receptori imaju bitnu ulogu u poticanju dugoročne plastičnosti kao što je dugoročni potencijal. Kainatni receptori čine samo mali dio udjela u sinaptičkom odgovoru, a njihova je uloga takva možda zbog spore kinetike. Kainatni receptori preferirano pridonose transmisiji jačih intenziteta i regulaciji sinaptičke transmisije postsinaptički. Metabotropni glutamatni receptori (mGluR) indirektno aktiviraju ionske kanale na membranama kroz signalnu kaskadu koja uključuje G proteine. Oni također sudjeluju u prijenosu bolnog podražaja (Zhuo, 2016).

1.1.5. PSD-95

PSD-95 (eng. ***p**ost**s**ynaptic **d**ensity protein **95***) glavni je konstrukcijski protein u postsinaptičkoj gustoći te član obitelji membranski-povezanih kinaza (MAGUK) koja se sastoji od PSD-95, PSD-93, SAP102 (eng. ***s**ynapse-**a**ssociated **p**rotein **102***) i SAP97. Tipična PSD (postsinaptička gustoća) sadrži 200-300 PSD proteina koji potencijalno vežu različite molekule među kojima i glutamatne AMPA i NMDA receptore. Međutim, način na koji zapravo PSD-95 organizira molekularnu arhitekturu postsinaptičke gustoće nije sasvim jasan (Chen i sur., 2011).

1.1.6. TERAPIJA BOLI

Uspješnom terapijom boli smatramo onu koja dovodi do analgezije bez nuspojava ili uz minimalne nuspojave primijenjenih lijekova. Dvije farmakološki različite skupine analgetika predstavljaju osnovu terapije boli: nesteroidni protuupalni (antiinflamatorni) lijekovi (NSAIL) i opioidi. NSAIL, poznatiji kao COX inhibitori prema mehanizmu djelovanja, smatraju se prvom linijom liječenja boli niskog ili srednjeg intenziteta, različite lokalizacije i etiološkog porijekla. Iako su opioidi najučinkovitiji lijekovi za terapiju boli, zbog profila nuspojava i rizika razvoja ovisnosti koriste se tek kod umjerene do jake akutne i kronične boli kod pacijenata s karcinomom te kod pacijenata s nemalignom boli (Bach-Rojecky i sur.,2019).

1.2. BOTULINUM TOKSIN TIPA A

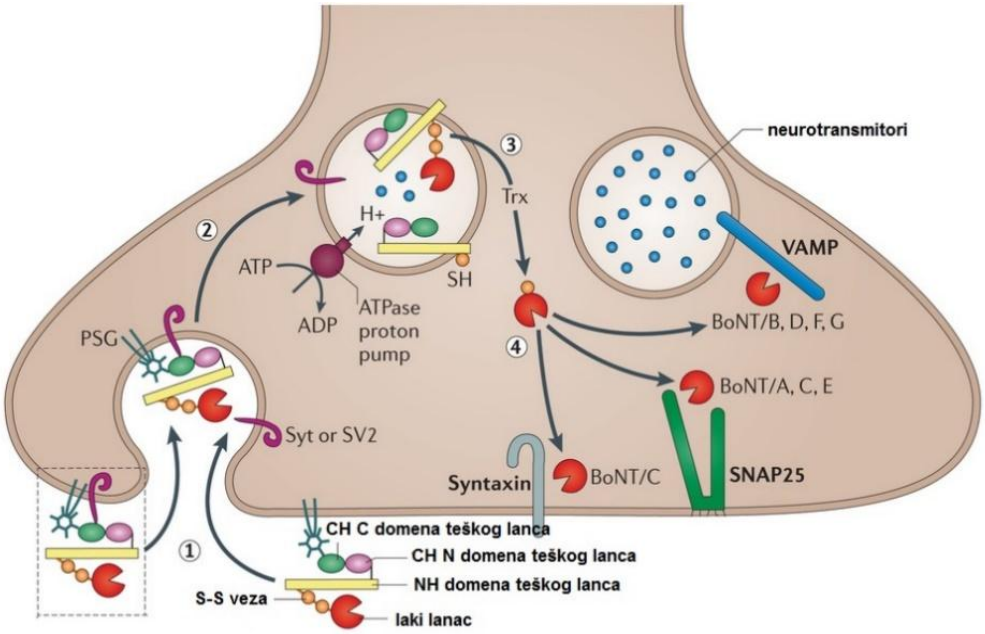
1.2.1. STRUKTURA I MEHANIZAM DJELOVANJA BOTULINUM TOKSINA TIPA A

Botulinum neurotoksini skupina su osam imunološki različitih serotipova (A-H) proteina koje sintetizira anaerobna bakterija *Clostridium botulinum* u obliku kompleksa biološki aktivnog dijela i netoksičnih proteina. Biološki se dio botulinum toksina (150 kDa) sastoji od dvaju polipeptidnih lanaca povezanih disulfidnom vezom koji tvore tri funkcionalno autonomne, ali međusobno ovisne domene (vežuća, translokacijska i katalitička) pomoću kojih toksini selektivno prepoznaju živčane završetke, ulaze u njih i potentno inhibiraju o kalciju ovisnu egzocitozu. Veći, teži lanac (HC; 100kDa) sadrži:

a) receptor-vežuću domenu (na karboksi kraju; Hc domena) pomoću koje se veže na akceptorske molekule na živčanom završetku (poligangliozide) i receptore (SV2 (engl., ***S****ynaptic Vesicle* ***P****rotein* ***2***) ili sinaptogmine, nakon čega nastupa o dinaminu ovisna endocitoza.

b) translokacijsku domenu (na amino kraju; Hn domena) koja translocira laki lanac u citosol. Ova se domena pritom ugrađuje u membranu sinaptičke vezikule/endosoma, a pod utjecajem kiselog pH u endosomu disulfidna veza se reducira, čime se kratki lanac odvaja od dugog. Manji, lakši lanac (LC; 50 kDa) je o cinku ovisna proteaza koja cijepa proteine iz SNARE-kompleksa (***S****oluble* ***N****SF* ***A****ttachment* ***P****rotein* ***RE****ceptor*) koji su nužni u procesu neuroegzocitoze, odnosno fuziji membrane sinaptičkih vezikula sa sinaptičkom membranom.

Posljedična inhibicija lučenja acetilkolina na neuromuskularnoj vezi i u autonomnim sinapsama rezultira mišićnom paralizom, suhim ustima, zamagljenim vidom i drugim tipičnim antikolinergičnim simptomima i znacima botulizma. Ovaj mehanizam djelovanja iskorišten je i u terapijske svrhe, odnosno u liječenju neuromuskularnih poremećaja karakteriziranih mišićnom hiperaktivnošću te autonomnih poremećaja karakteriziranih hipersekrecijom. Osim acetilkolina, u *in vitro* pokusima pokazalo se da BT-A inhibira otpuštanje i drugih neurotranzmitora te i iz ne-kolinergičkih sinapsi poput serotonina, dopamina, noradrenalina, glutamata, GABA (*gamma-aminobutyric acid*), enkefalina, glicina, tvari P, ATP-a (*adenosine triphosphate*) i CGRP-a (*calcitonin gene-related peptide*) (Matak i Lacković, 2014). Tim se otkrićem pojavila i mogućnost liječenja i drugih vrsta poremećaja poput boli.



Slika 3. Mehanizam djelovanja BT (prema Rossetto i sur., 2014): 1) vezanje karboksi-kraja domene teškog lanca (HC-C domena) za poligangliozide (PSG), sinaptotagmin (Syt) ili SV2na presinaptičkoj membrani.; 2) endocitoza BT u sinaptičke vezikule uz potrošnju ATP-a aktivnošću vezikularne protonske pumpe. Zakiseljavanjem sinaptičkih vezikula, BT se protonira, što rezultira 3) translokacijom lakog lanca iz sinaptičke vezikule u citosol. Laki lanac se oslobađa s HN domene djelovanjem tioredoksin reduktaza-tiroredoksin sustava (TrxR–Trx), što cijepa disulfidnu (S-S) vezu; 4) Laki lanac serotipova B, D, F i G cijepaju VAMP, A i E SNAP-25, C cijepa SNAP-25 i sintaksin, što rezultira inhibicijom lučenja neurotransmitora.

1.2.2.KLINIČKA PRIMJENA BT-A

Iako postoje različiti serotipovi BT-a, trenutno su u terapijskoj primjeni samo BT-A i BT-B te uključuju :

A) BT-A komplekse (na tržištu Botox® i Dysport®.)

B) BT-B komplekse (na tržištu MyoBloc® u SAD-u i NeuroBloc® u Europi)

C) izolirani BT-A bez netoksičnih proteina, odnosno samo biološki aktivan dio (na tržištu Xeomin®)

Iako netoksični dio proteina nema terapijsku ulogu, njegova je uloga važna u stabilnosti BT formulacija. Općenito, zahvaljujući tom dijelu kompleksa, BT su rezistentni na okolišne čimbenike kao što su pH, temperatura i proteaze te se smatra da štite biološki aktivni dio molekule od proteolize i denaturacije pri visokoj temperaturi ili kiselom pH, odnosno prilikom prolaska kroz probavni sustav i u izvanstaničnom prostoru (Gu i Jin, 2013). Međutim, komercijalni proizvodi sadrže dodatne pomoćne tvari koje mogu utjecati na stabilnost proizvoda. Primjerice, dodatak natrijeva klorida (Botox®) ili laktoze (Dysport®) štiti od gubitka steričke konformacije BT-a. Humani serumski albumin se također dodaje da se spriječi gubitak od adsporpcije na površinu staklenih spremnika tijekom proizvodnje, skladištenja i primjene (Kumar i sur., 2016).

Mogućnost lokalne primjene pikomolarnih doza pročišćenog BT-A, kao i dugo djelovanje (u ljudi do 6 mjeseci), osnova je njegove više od 20 godina duge kliničke primjene u liječenju neuromuskularnih poremećaja karakteriziranih povećanim tonusom ili hiperaktivnošću mišića, poput strabizma i blefarospazma, ali i hipersekrecijskih autonomnih poremećaja, poput primarne aksilarne hiperhidroze i urinarne inkontinencije te kozmetičke primjene (Lim i Seet, 2010). BT-A se primjenjuje supkutano u dozi od 100-300 i.j. Primjena je bolna, a da se bol pri primjeni smanji, koriste se lokalni anasetici i inhalacija 50% dušikovog oksida i kisika. Unatoč bolnoj primjeni, liječenje s BT-A smatra se sigurnim (Attal, 2018). Iako potencijalni mehanizam djelovanja u senzornim sinapsama još nije poznat, BT-A smanjuje bol u brojnim poremećajima poput trigeminalne neuralgije, križobolje, miofascijalne boli i dr. u kojima se koristi *off-label*, dok je za sada jedina odobrena primjena za prevenciju kronične migrene (Dodick i sur., 2010).

1.2.3. ANALGETSKI UČINAK BT-A

Povoljno djelovanje BT-A na bol najprije je uočeno kod bolesnika s cervikalnom distonijom, a smatralo se posljedicom smanjene mišićne kontrakcije (Drinovac Vlah, 2017). Međutim, kasnije se pokazalo da u nekim slučajevima a) dolazi do antinociceptivnog djelovanja i kod pacijenata kod kojih nije došlo do poboljšanja distonije; b) ne dolazi uvijek do simultanog antinociceptivnog i paralitičkog djelovanja; c) ponekad antinociceptivni učinak traje i dugo nakon što neuromuskularni učinci nisu više vidljivi. Štoviše, pokazano je da je doza potrebna za antinociceptivan učinak (50 i.j.) puno manja nego doza potrebna za poboljšanje motorike (100-150 i.j.). Iz toga je zaključeno da BT-A ima potencijalni učinak na živčani senzorni ili vegetativni sustav (Matak i Lacković, 2014). Inicijalna istraživanja na životinjskim modelima dovela su do hipoteze da se mehanizam djelovanja BT-A temelji na inhibiciji otpuštanja neurotransmitora na periferiji sa završetaka senzornih neurona preko cijepanja SNAP-25 proteina (slično inhibiciji otpuštanja acetilkolina s neuromuskularne spojnice) i posljedično indirektnoj inhibiciji središnje senzitizacije (Cui i sur., 2004; Aoki i Francis, 2011). Antinociceptivno djelovanje periferno (supkutano u stražnju šapu štakora) primijenjenog BT-A proučavano je na modelu upalne boli uzrokovane injiciranjem formalina. U prvoj fazi, koja je uzrokovana direktnim stimuliranjem perifernih živčanih završetaka formalinom, nije došlo do smanjenja boli. No u drugoj (upalnoj) fazi dolazi do smanjenja boli (Cui i sur., 2004). U stražnjoj šapia štakora kojima je dan BT-A došlo je do izostanka porasta razine glutamata te smanjenja edema, zbog čega se smatralo da je antinociceptivno djelovanje BT-A povezano s perifernim protuupalnim učinkom (Aoki, 2005; Cui i sur., 2004). Antinociceptivni i protuupalni učinak BT-A pokazani su i na modelu boli uzrokovane kapsaicinom kod ljudi (Gazerani i sur., 2006; Tugnoli i sur., 2007). Međutim, istraživanja na animalnim modelima upalne boli uzrokovane karagenanom ili kapsaicinom 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). U istraživanju modela zrcalne boli pokazano je moguće središnje porijeklo antinociceptivnog djelovanja BT-A. U ovom je modelu štakorima davana kisela fiziološka otopina u desni *m. gastrocnemius* kako bi se izazvala bilateralna hiperalgezija na objema stražnjim šapama. Za ovakav oblik bilateralne hiperalgezije smatra se da nastaje središnjom senzitizacijom i supraspinalnim bilateralnim putovima. U pokusu je uočeno da se perifernom primjernom BT-A u stražnju šapu smanjuje bol na strani ozljede (ispilateralno), ali i na suprotnoj strani (kontralateralno). U daljnjim istraživanjima pokazano

je da je u antinociceptivno djelovanje uključen retrogradni aksonalni transport putem perifernih živaca prema središnjem živčanom sustavu te učinak u dorzalnom rogu kralješnične moždine, ali ostaje nepoznato odvija li se transport u motornim ili senzornim neuronima (Bach-Rojecky i Lacković, 2009).

Unatoč svim naporima, točan mehanizam antinociceptivnog djelovanja BT-A još uvijek nije razjašnjen, no kompleksni mehanizmi nocicepcije ostavljaju još dosta prostora za istraživanje.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Botulinum toksin tipa A klostridijski je neurotoksin koji proteolitički cijepa SNAP-25 i posljedično inhibira lučenje neurotransmitora i/ili mijenja ekspresiju receptora na živčanim završecima (Matak i Lacković, 2014). BT-A je još 2010. odobren za prevenciju kronične migrene, a mogao bi biti učinkovit i u liječenju različitih drugih bolnih stanja karakteriziranih bolnom preosjetljivošću. No, mehanizam njegovog antinociceptivnog djelovanja još uvijek nije potpuno jasan. Dugo se smatralo da je antinociceptivno djelovanje ograničeno lokalno na mjesto injiciranja i njegovu okolinu, analogijom s djelovanjem na neuromuskularnoj spojnici i učinku u neuromuskularnim poremećajima kod kojih je BT-A do tada korišten. Međutim, posljednjih godina raste broj dokaza da je za antinociceptivno djelovanje BT-A važan retrogradni aksonalni transport, odnosno da toksin s mjesta primjene putuje u središnji živčani sustav, gdje bi mogao inhibirati lučenje tzv. „bolnih“ neurotransmitora iz središnjih završetaka primarnih aferentnih neurona, i/ili transport ili umetanje receptora u plazmatske membrane.

S obzirom na to da BT-A ne djeluje na akutne bolne podražaje, a smanjuje hiperalgeziju i alodiniju, odnosno vrste bolne preosjetljivosti koje nastaju središnjom senzitizacijom (Bach-Rojecky, 2006), cilj je ovog diplomskog rada istražiti utjecaj periferno (u šapu) primijenjenog BT-A na ekspresiju glutamatnih NMDA i AMPA receptora, kao i njihovih fosforiliranih formi u dorzalnom rogu kralješnične moždine *western blot* metodom u modelu upalne boli uzrokovane formalinom. Kako je prethodno objašnjeno, NMDA receptori smatraju se ključnim pokretačem središnje senzitizacije, dok se posljedična fosforilacija NMDA i AMPA receptora može promatrati kao mjera središnje senzitizacije. Uzorci dorzalnog roga kralješnične moždine muških Wistar štakora dobiveni su prethodnim bihevioralnim testiranjem u kojem je pokazano da kombinacija NMDA antagonista, primijenjenog intratekalno, i BT-A, primijenjenog periferno supkutano u stražnju šapu, ima aditivni antinociceptivni učinak (Bach-Rojecky i sur., 2017).

Razjašnjenje mehanizma djelovanja BT-A na spinalnoj razini doprinijelo bi daljnjem razvoju antinociceptivnog potencijala i primjene BT-A, koji je za sada jedini lijek koji u različitim eksperimentalnim i kliničkim istraživanjima ima dugotrajni učinak (više tjedana, pa i mjeseci) nakon jednokratne lokalne primjene niskih (pikomolarnih) doza (Jabbari i Machado, 2011).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. UZORCI TKIVA

U istraživanju su korišteni uzorci dorzalnog roga kralješnične moždine mužjaka štakora soja Wistar u dobi od tri mjeseca, težine prosječno 350 g, uzgajanih u 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 pručavanje boli (International Associaton for Study of Pain, IASP). Za obavljanje pokusa na projektu, kojih je ovaj diplomski rad dio, dobivena je dozvola Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane Ministarstva poljprivrede Republike Hrvatske (br.72.3-13, HR 191/02/P).

3.2. ISPITIVANE TVARI

U pokusu su korišteni BT-A (Botox® , Allergan, SAD) i AP-5 (Sigma-Aldrich-Aldrich, St. Louis, MO, 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 otopljen je u fiziološkoj otopini (0.9 % NaCl) i primijenjen u dozi od 5 i.j./kg i ukupnom volumenu od 20 μL supkutano u plantarnu površinu stražnje šape štakora pet dana prije izvođenja formalinskog testa (Slika 4).

Bočica AP-5 (2-amino-5-fosfopentanoična kiselina), specifičnog antagonista NMDA receptora, sadrži AP-5 u čvrstom obliku, koji je otopljen u fiziološkoj otopini kako bi se dobile ispitivane doze (1, 5 i 10 μg) koje su u volumenu od 10 μL primijenjene štakorima intratekalno 10 minuta prije formalinskog testa pod izofluranskom inhalacijskom anestezijom.

3.3. KEMIKALIJE I REAGENSI

Za izradu gelova i pufera (tablica 1) u postupcima elektroforeze i *western blota* korištene su sljedeće kemikalije: deaerirana, destilirana, deionizirana (DDD) voda, Tris (TRIZMA® base, Sigma-Aldrich, SAD), akrilamid (*Acrylamide*, Sigma-Aldrich, SAD), bisakrilamid (*Bis-N,N-methylen-bis-acrilamide*, Sigma-Aldrich, SAD), amonij persulfat (*Ammonium persulfate*, Sigma-Aldrich, SAD), TEMED (*TEMED*, Sigma-Aldrich, SAD), mlijeko u prahu, Tween 20 (Sigma-Aldrich, SAD), boja Ponaceau (*Ponaceau solution*, Sigma-Aldrich, SAD), 2-merkaptoetanol (2-Mercaptoathanol, MERCK-Schurchardt, Njemačka), metanol (Kemika, Hrvatska), HCl, SDS (*Sodium dodecil sulphate*, Sigma-Aldrich, SAD), glicerol (Glycerol anhydrous, Fluka, Švicarska), glicin za elektroforezu (Sigma-Aldrich-Aldrch, SAD).

Tablica 1. Način pripreme otopina korištenih u elektroforezi i western blot metodi.

OTOPINA	NAČIN PRIPREME
4x TrisCl/SDS ph 8.8	-pomiješati: • 18.2 g Tris pufera • 60 mL vode -postaviti pH na 8.8 s 1N HCl -do 100 mL ukupnog volumena dodati vodu -filtrirati i dodati 0.4g SDS
4x TrisCl/SDS ph 6.8	-pomiješati: • 1.5 g Tris pufera • 10 mL vode -postaviti pH na 6.8 s 1N HCl -do 25 mL ukupnog volumena dodati vodu -filtrirati i dodati 0.1 g SDS-a
10% amonij persulfat (APS)	-pomiješati: • 30 g akrilamida • 0.8 g bisakrilamida -do 100 mL ukupnog volumena dodati vodu i filtrirati
30% akrilamid/0.8% bisakrilamid	-umiješati 0.1 g u 1 mL vode
SAMPLE BUFFER	-pomiješati: • 2 mL glicerola • 0.6 g SDS-a + 6 mL vode • 2.5 mL Tris pufera (1.21 g + 10 mL vode; postaviti pH na 6.7 s 1N HCl) • ~ 3 mg *brom-phenol blue*
LOADING BUFFER	-pomiješati: • SAMPLE BUFFER-A • 10% β-merkaptoetanola

10X RUNNING BUFFER	-pomiješati: • 10 g SDS-a + 100 mL vode • 30 g Tris pufera + 115.2 g glicina -do 1L ukupnog volumena dodati vodu
10X TRANSFER BUFFER	-pomiješati: • 22.32 g Tris pufera • 105 g glicina -do 1L ukupnog volumena dodati vodu
LSWB	-pomiješati: • 1.211 g Tris pufera • 8.766 g NaCl - do 1L ukupnog volumena dodati vodu -postaviti pH na 7.5 s 1N HCl

- ❖ za elektroforezu se koristi 1X RUNNING BUFFER! Potrebno je razrijediti koncentrirani 10X RUNNING BUFFER
- ❖ za transfer se koristi 1X TRANSFER BUFFER! Potrebno je razrijediti 10X TRANSFER BUFFER
- ❖ za filtriranje se koristi 0.45 μm filter papir
- ❖ otopine za gel pripravljaju se s deaeriranom, deioniziranom, destiliranom H20

U postupku su korištene Bio-Rad kadice i aparat (*PowerPack JR II Power supply* Bio-Rad, SAD), nitrocelulozne membrane veličine pora 0,2 μm (*Nitrocellulose membrane*, Sigma-Aldrich, SAD), sekundarna protutijela (*anti-mous*e i *anti-rabbit*) spojeno na HRP enzim (peroksidaza iz hrena) (Cell Signalling, kemoluminiscent Clarity Max ECL (Bio-Rad, SAD). Korištena primarna protutijela navedena su u tablici 2.

Tablica 2. Lista primarnih protutijela korištenih u *western blotu*.

Protutijelo	Proizvođač, kataloški broj	Molekularna težina (kDa)	Inkubacijski uvjeti (koncentracija, temperatura)
AMPA receptor; GluR1 podjedinica	Merck, AB1504	106	1:2000,4° C preko noći
pAMPA receptor; GluR1 fosfoSer845 podjedinica	Merck, AB5849	100	1:2000, 4° C preko noći
NMDA receptor; NR1 podjedinica	Merck, AB9864	120	1:1000, 4° C preko noći
pNMDA receptor; NR1 fosfoSer897 podjedinica	Merck, ABN99	~120	1:2000, 4° C preko noći
PSD95	Cell Signaling, 2507	95	1:2000, 4° C preko noći

3.4. EKSPERIMENTALNI PROTOKOLI

3.4.1. Bihevioralni dio pokusa: formalinski test

Ukupno 48 Wistar štakora korišteno je u bihevioralnom dijelu pokusa, u kojem je ispitano antinociceptivno djelovanje BT-A (5 i.j./kg; 20 μL supkutano u stražnju desnu šapu pet dana prije testiranja), tri doze NMDA antagonista AP-5 (1, 5 i 10 μg/ 10μL intratekalno 10 minuta prije testiranja) te njihove kombinacije u modelu upalne boli uzrokovane injiciranjem 5% formalina (50 μL) s.c. u stražnju desnu šapu štakora (tzv. „formalinski test“). Bol je praćena kao broj lizanja i trzanja šape u razdoblju od 60 min nakon injiciranja formalina.

Injiciranje formalina u šapu štakora uzrokuje reproducibilan dvo-fazični odgovor. Prva je faza (0 – 15 min) posljedica izravnog podražaja nociceptora formalinom. Druga faza (15 – 60 min) posljedica je djelovanja oslobođenih upalnih medijatora, a pretpostavlja se i periferne te središnje senzitizacije (Tjolsen i sur., 1999). U ovom diplomskom radu korišteni su uzorci dorzalnog roga kralješnične moždine štakora tretiranih kombinacijom BT-A i najveće ispitane doza NMDA antagonista (10 μg), s obzirom na to da je u bihevioralnom dijelu pokusa tim dozama pokazan aditivan učinak (Bach-Rojecky i sur., 2017).

3.4.2. WESTERN BLOT ANALIZA

3.4.2.1. PRIPREMA TKIVA ZA WESTERN BLOT ANALIZU

Svježe smrznuti uzorci tkiva dorzalnog roga kralješnične moždine odmrznu se i homogeniziraju s tri volumena pufera za liziranje koji se sastoji od 10 mM HEPES, 1 mM EDTA, 100 mM KCl, 1% Trixton X-100, ph 7.5 i koktela inhibitora proteaza (1:100). Nastali homogenizat centrifugira se na 12000 rpm (13700 xg) 10 minuta na 4 °C te se nastali supernatant smrzne i skladišti na -80 °C. Koncentracija proteina mjeri se Lowry protein testom.

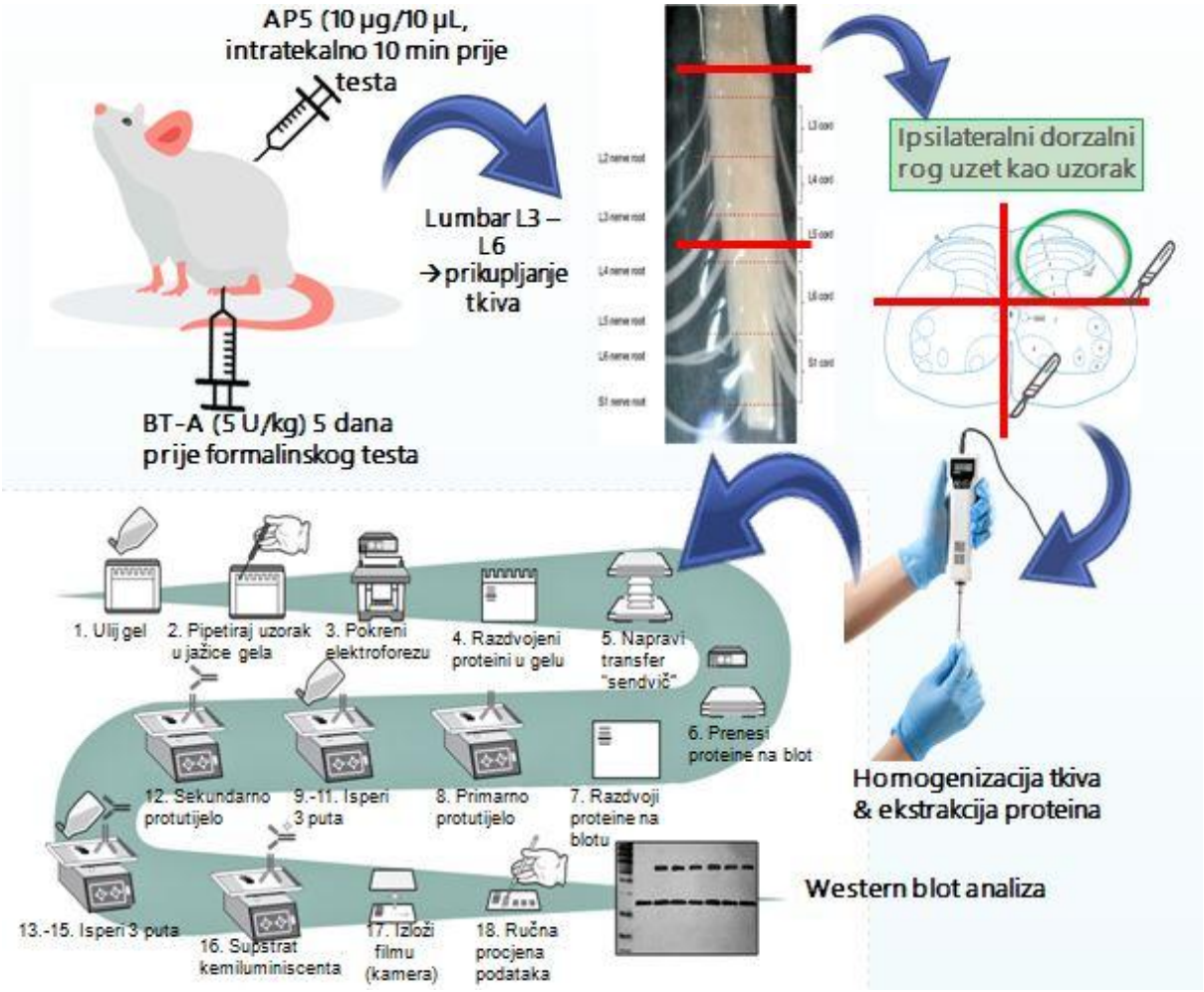
3.4.2.2. WESTERN BLOT ANALIZA

Jednake količine ukupnih proteina dorzalnog roga kralješnične moždine (35 μg po uzorku) razdvojene su SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis) s 9% poliakrilamidnim gelom i transferirane na nitrocelulozu membranu.

Nitrocelulozne membrane blokirane su jedan sat na sobnoj temperaturi u 5% otopini nemasnog mlijeka dodanog u LSWB (low-salt washing buffer) koji sadrži 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5 i 0.5% Tween 20. Blokirani blotovi inkubirani su s primarnim protutijelom. Inkubacijski uvjeti koncentracije i temperature određeni su preliminarnim pokusima te su navedeni u tablici 1. za svako korišteno protutijelo. Nakon inkubacije membrane su isprane tri puta s LSWB i inkubirane jedan sat na sobnoj temperaturi sa sekundarnim protutijelom (*anti-rabbit* IgG, 1:2000). Nakon ispiranja u LSWB imunoreaktivni signali vizualizirani su pomoću kemilumiscenta kao detektirajućeg reagensa. Signali su detektirani i vizualizirani pomoću MichroChemi video-kamera sustava (DNR, Bio-Imaging Systems). Membrane su isprane tri puta u LSWB, blokirane na isti način, inkubirane preko noći s β-aktinom (1:2000) na 4 °C ili dva sata na sobnoj temperaturi za detekciju isti dan. Membrane su isprane i inkubirane jedan sat na sobnoj temperaturi s otopinom sekundarnog protutijela (*anti-mouse* IgG 1:2000), isprane u LSWB i prekrivene kemiluminiscentom. Signali su zabilježeni i vizualizirani pomoću MicroChemi videokamera sustava.

3.4.2.3. STATISTIČKA ANALIZA

Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina ± standardna srednja pogreška i prikazani u obliku grafa sa stupcima. Za statističku analizu korišten je GraphPad Prism 5 statistički *software*. Nakon cjeloukupne analize Kruskal-Wallis testom razlike između skupina analizirane su Mann-Whitney U-testom. Značajne su sve p vrijednosti od 0.05 ($p<0.05$).



Slika 4. Prikaz cijelog postupka od tretiranja Wistar štakora, preko uzimanja tkiva dorzalnog roga i homogenizacije tkiva do elektroforeze i western blot analize.

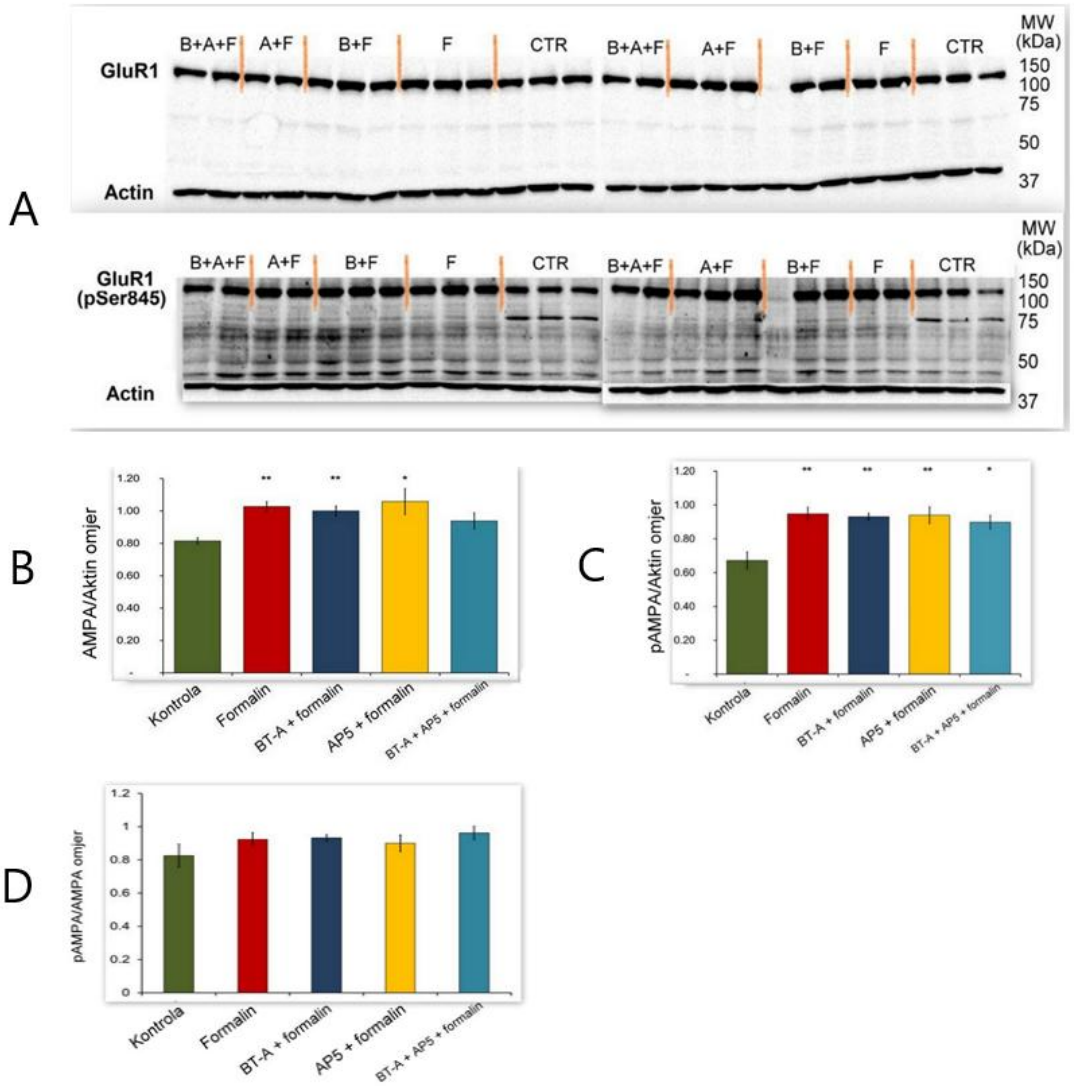
4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom diplomskom radu istraživali smo jesu li u središnji mehanizam antinociceptivnog djelovanja BT-A uključene potencijalne promjene (odnosno smanjenje) ekspresije spinalnih glutamatnih AMPA i NMDA receptora, njihovih fosforiliranih oblika (ovdje označeno kao P-AMPA, P-NMDA) te PSD-95 proteina kao jednih od markera centralne senzitizacije (v. poglavlje „Mehanizmi periferne i centralne senzitizacije“) uključene u mehanizam nastanka patološke boli (hiperalgezije i alodinije). Naime, u brojnim pretkliničkim i kliničkim modelima boli pokazano je da BT-A ne djeluje na akutne bolne podražaje, ali smanjuje bolnu preosjetljivost različitih uzroka (upalnu, neuropatsku) koja nastaje kao posljedica centralne senzitizacije (Drinovac Vlah, 2017).

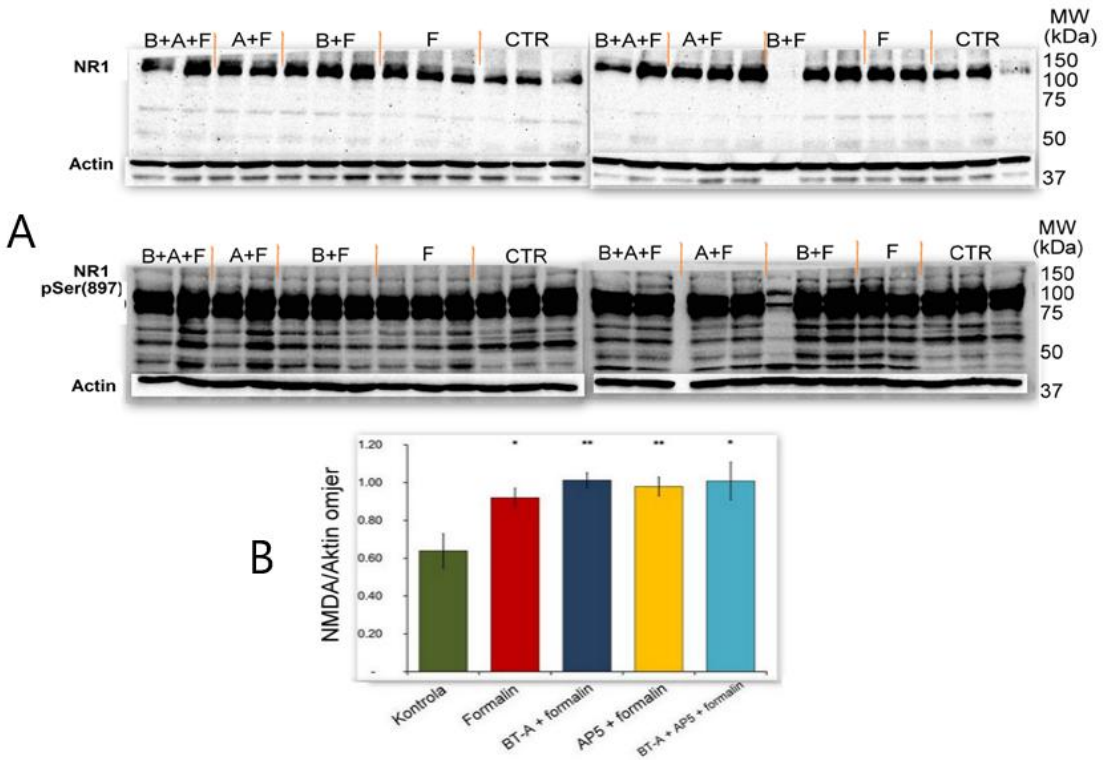
U ovu analizu uključeno je nekoliko skupina životinja: kontrola, odnosno netretirane životinje te formalinom tretirane skupine životinja, kojima je injicirana fiziološka otopina ili BT-A (5 i.j./kg, s.c u stražnju šapu) pet dana prije i/ili NMDA antagonist AP-5 (10 µg/10 µL, intratekalno) 10 min prije formalinskog testa. U prethodnom bihevioralnom testiranju intratekalna primjena NMDA antagonista u kombinaciji s periferno (u šapu) injiciranim BT-A imala je aditivan učinak u smanjenju upalne boli uzrokovane formalinom (Bach-Rojecky i sur., 2017), a upućuje na to da bi u antinociceptivno djelovanje BT-A mogao biti uključen glutamatni sustav na spinalnoj razini. NMDA anagonist AP-5 kompetitivno blokira vezanje glutamata na NMDA receptore na postsinaptičkim neuronima i tako inhibira prijenos bolnog podražaja. Jedini za sada poznati mehanizam djelovanja BT-A jest inhibicija lučenja neurotransmitora cijepanjem SNAP-25 proteina te se smatra da je njegovo antinociceptivno djelovanje posljedica inhibicije lučenja bolnih neurotransmitora iz središnjih završetaka primarnih aferentnih neurona, pa čak i inhibicija umetanja receptora uključenih u prijenos bolnog impulsa u postsinaptičke membrane (Drinovac Vlah, 2017). Hipotetski, time bi aditivan učinak kombinacije BT-A i AP-5 u smanjenju boli mogao biti posljedica blokade NMDA receptora NMDA antagonistom te inhibicije lučenja glutamata djelovanjem BT-A, odnosno u konačnici jača i potpunija inhibicija centralne senzitizacije. Stoga je u ovom diplomskom radu analizirana ekspresija gore navedenih receptora *western blot* metodom u homogeniziranim uzorcima dorzalnog roga kralješnične moždine (L3 – L5 segment) mužjaka Wistar štakora, dobivenih nakon provedenog formalinskog testa. Rezultati dobiveni *western blot* analizom kvantificirani su u programu ImageJ te statistički obrađeni i prikazani grafički. Prikazane su također i slike membrana.

Potpuna analiza izvedena je samo za AMPA receptor (slika 3) i PSD-95 protein (slika 5), za koje su preliminarno pronađeni pogodni uvjeti za blokiranje nespecifičnog vezanja te inkubaciju primarnih protutijela. Za protutijelo na fosforilirani oblik NMDA receptora, promjenama blokirajućeg agensa (primjena goveđeg albumina umjesto mlijeka u prahu) te koncentracija primarnih i sekundarnih protutijela, nisu se uspjeli pronaći adekvatni uvjeti kako bi se dobio čisti signal na 120 kDa te je stoga analizirana samo ekspresija NMDA receptora (slika 4).

Na priloženim se grafovima vidi da je u skupini životinja tretiranih formalinom statistički značajan porast ekspresije AMPA, P-AMPA i NMDA receptora u odnosu na kontrolne, netretirane životinje, što korelira s bihevioralnim rezultatima i literaturnim nalazima: u dorzalnom rogu životinja s upalnom boli povećana je ekspresija glutamatnih receptora i njihovih fosforiliranih oblika (Petrenko i sur., 2003.; Pezet i sur., 2008; Liu i Salter, 2010., Hong i sur., 2017). Međutim, nakon periferne primjene BT-A, kao i intratekalne primjene samog NMDA antagonista te njihove kombinacije ne dolazi do očekivanog smanjenja ekspresije promatranih receptora u našim eksperimentalnim uvjetima. Mogući razlog ovakvog rezultata proizlazi iz nedavno objavljenog rada u kojem je ispitan utjecaj BT-A na ekspresiju AMPA receptora i lučenje glutamata u dorzalnom rogu kralješnične moždine u formalinskom testu (Hong i sur., 2017). U ovom su radu autori, koristeći posebnu tehniku homogenizacije tkiva, pokazali da BT-A smanjuje ekspresiju samo membranske frakcije AMPA receptora, dok nema učinka na ekspresiju ukupnih AMPA receptora, što se podudara s našim nalazom. Osim toga, pokazali su i da BT-A inhibira lučenje glutamata uzrokovano formalinom, što pak postavlja pitanje zašto to ipak za posljedicu nema smanjenje ekspresije ukupnih receptora u dorzalnom rogu, budući da su vezanje glutamata za NMDA receptore i posljedične promjene ključni mehanizam centralne senzitizacije. S obzirom na to, drugi mogući razlog našeg rezultata mogao bi biti u korištenom modelu akutne upalne boli, u kojem potencijalne promjene nakon primjene NMDA antagonista i BT-A nisu vidljive u kratkom vremenu (uzorkovanje jedan sat nakon uzrokovanja boli formalinom). Stoga bi se u daljnjem rasvjetljavanju uloge glutamatnog sustava u antinociceptivnom djelovanju BT-A mogao ispitati u kroničnom modelu boli poput upalne boli uzrokovane primjenom kompletnog Freundovog adjuvansa (CFA) ili neuropatske boli.



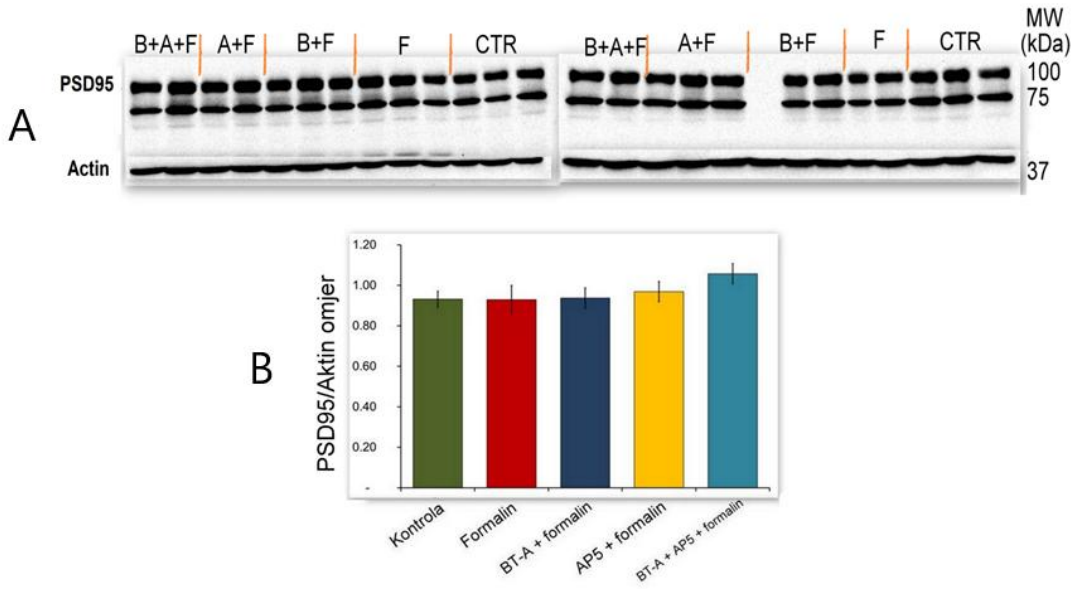
Slika 5. Ekspresija ukupnih i fosforiliranih AMPA receptora u ipsilateralnom dorzalnom rogu. A) Membrane tretiranih kemilumiscentom: Na prvoj su membrani ispitivani AMPA receptori, a na drugoj AMPA receptori s fosforiliranom GluR1 podjedinicom (P-AMPA); B, C) pripadajući grafovi koji prikazuju ekspresiju receptora normiranih prema prema β-aktinu te D) grafički prikaz omjera ukupnih i fosforiliranih AMPA receptora.
* P<0.05; ** P<0.01 u usporedbi s kontrolom



Slika 6. Ekspresija ukupnih i fosforiliranih NMDA receptora u ipsilateralnom dorzalnom rogu. A) Membrane tretiranih kemilumiscentom: Na prvoj su membrani ispitivani NMDA receptori, a na drugoj NMDA receptori s fosforiliranom NR1 podjedinicom (P-NMDA); B) pripadajući graf koji prikazuje ekspresiju NMDA receptora normiranih prema prema β-aktinu.
* P<0.05; ** P<0.01 u usporedbi s kontrolom

Ekspresija PSD-95 proteina nepromijenjena je u svim skupinama. NMDA receptori usidreni su u postsinaptičkoj membrani interakcijom između citoplazmatskog C-kraja NR2 podjedinice i PDZ (postsynaptic density) domena PSD-95/SAP90, obilnih skeletnih proteina koji povezuju specifični set signalnih proteina oko NMDA receptora (Petrenko i sur., 2003). U pretkliničkim modelima istražuju se lijekovi koji blokiraju veze NMDA receptora i PSD-95 proteina kao potencijalni analgetici. Nije u potpunosti jasno zašto u formalinskom testu ne dolazi do porasta PSD-95 proteina, no prema jednom literaturnom nalazu, čini se da su promjene ekspresije PSD-95 proteina vidljive tek u kroničnim neuropatskim modelima boli. Koristeći miša koji eksprimira skraćeni oblik PSD-95 molekule, pokazano je da takva životinja ne razvija o NMDA-receptoru ovisnu hiperalgeziju i alodiniju u modelu

neuropatske boli uzrokovane konstrikcijom živca, dok ispoljava normalnu upalnu bol nakon injiciranja formalina (Garry i sur., 2003). Prema tome, potencijalni učinak BT-A na PSD-95 bilo bi potrebno ispitati u kroničnom modelu boli.



Slika 7. Ekspresija ukupnih PSD-95 proteina u ipsilateralnom dorzalnom rogu. A) Membrana tretirana kemilumiscentom.; B pripadajući graf koji prikazuje ekspresiju proteina normiranih prema prema β-aktinu.
* P<0.05; ** P<0.01 u usporedbi s kontrolom

5. ZAKLJUČAK

U ovom je radu metodom *western blota* mjerena ekspresija spinalnih glutamatnih ukupnih i fosforiliranih AMPA i NMDA receptora te PSD-95 proteina kao markera centralne senzitizacije u dorzalnom rogu kralješnične moždine Wistar štakora. Rezultati kvantifikacije ekspresije glutamatnih receptora nisu pokazali očekivano smanjenje ekspresije. Međutim, daljnje istraživanje na kroničnom modelu boli te membranskoj frakciji glutamatnih receptora potrebno je za potpuno razjašnjenje uloge glutamatnog sustava u antinociceptivnom mehanizmu BT-A.

6. LITERATURA

Aoki KR, Francis J. Updates on antinociceptivemechanism hypothesis of botulinum toxin A. *Parkinsonism Relat Disord,* 2011., 1, S28-33

Aoki KR. Review of a proposed mechanism for the antinociceptive action of botulinum toxin type A. *Neurotoxicology,* 2005., 26(5), 785-93

Attal N. Pharmacological treatments of neuropathic pain: The latest recommendations. *Rev Neurol,* 2018., 175(1-2), 46-50

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

Bach Rojecky L, Drinovac Vlah V, Lacković Z. Botulinum toxin type A and NMDA antagonist: additive antinociceptive effect at the spinal level. EFIC, Kopenhagen, 2017., https://mef.unizg.hr/wp-content/uploads/2018/01/Bach-Rojecky-et-al.-2017-EFIC.pdf?rs_file_key=20058981535d6d372dcf51a931885549, pristupljeno 20.8.2019.

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(5), 503-9.

Bach-Rojecky L, Vađunec D, Žunić K, Kurija J, Šipicki S, Gregg R, Mikula I, Primorac D. Continuing war on pain: a personalized approach to the therapy with nonsteroidal anti-inflamatory drugs and opioids. *Per Med,* 2019., 16(2), 171-184

Bach-Rojecky L, Lacković Z. Central origin of the antinociceptive action of botulinum tokxin type A. *Pharmacol, Biochem Behav,* 2009., 94(2), 234-8

Bourne S, Machado AG, Nagel SJ. Basic Anatomy and Pysiology of Pain Pathways. *Neurosurg Clin N Am,* 2014., 25(4), 629-638

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

Cordero-Erausquin M, Inquimbert P, Schlichter R, Hugel S. Neuronal networks and nociceptive processing in the dorsal horn of the spinal cord. *Neuroscience,* 2016., 338, 230-247

Chen X, Nelson CD, Li X, Winters CA, Azzam R, Sousa AA, Leapman RD, Gainer H, Sheng M, Reese TS. PSD-95 is required to sustain molecular organization of the postsynaptic density. *J Neurosci,* 2011., 31(17), 6329-38

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

Das V. An Introduction to Pain Pathways and Pain „Targets". *Prog Mol Biol Transl Sci,* 2015., 131, 1-30

Dodick DW, Turkel CC, DeGryse RE, Aurora SK, Silberstein SD, Lipton RB, Diener HC, Brin MF; PREEMPT Chronic Migraine Study Group. OnabotulinumtoxinA for treatment of chronic migraine: pooled results from the double-blind, randomized, placebo-controlled phases of the PREEMPT clinical program. *Headache,* 2010., 50(6), 921-936

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

Fernandes V, Sharma D, Vaidya S, P A S, Guan Y, Kalia K, Tiwari V. Cellular and molecular mechanisms driving neurophatic pain:recent advancements and challenges. *Expert Opin Ther Targets,* 2018., 22(2), 131-142

Gazerani P, Staahl C, Drewes A, 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(3),315-325

Garry EM, Moss A, Delaney A, O' Neill F, Blakemore J, Bowen J, Husi H, Mitchell R, Grant SG, Fleetwood-Walker SM. Neuropathic sensitization of behavioral reflexes and spinal NMDA receptor/CaM kinase II interactions are disrupted in PSD-95 mutant mice. *Curr Biol*, 2003., 13(4), 321-8

Hong B, Yao L, Ni L, Wang L, Hu X. Antinociceptive effect of botulinum toxin A involves alterations in AMPA receptor expression and glutamate release in spinal dorsal horn neurons. *Neuroscience,* 2017., 357, 197-207

Jabbari B. History of botulinum toxin treatment in movement disorders. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N.Y.),* 2016., 6, 394

Jabbari B, Machado D. Treatment of refractory pain with botulinum toxins--an evidence-based review. *Pain Med,* 2011., 12(11), 1594-1606

Ji RR, Xu ZZ, Gao YJ. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nat Rev Drug Discov,* 2014., 13(7):533-548

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

Lim EC, Seet RC. Use of botulinum toxin in the neurology clinic. Nat Rev Neurol, 2010., 6(11), 624-36.

Liu XJ, Salter MW. Glutamate receptor phosphorylation and trafficking in pain plasticity in spinal cord dorsal horn. *Eur J Neurosci*, 2010., 32(2), 278-89

Matak I, Lacković Z. Botulinum neurotoxin type A: Actions beyond SNAP-25? *Toxicology*, 2015, 335, 79-84

Matak I, Lacković Z. Botulinum toxin A, brain and pain. *Prog Neurobiol*, 2014., 119-120, 39-59

Orr PM, Shank BC, Black AC. The Role of Pain Classification Systems in Pain Management. *Crit Care Nurs Clin North Am*, 2017., 29 (4), 407-418

Petrenko AB, Yamakura T, Baba H, Shimoji K. The Role of N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Receptors in Pain: A Review. *Anesth Analg*, 2003., 97(4), 1108-16.

Pezet S, Marchand F, D'Mello R, Grist J, Clark AK, Malcangio M, Dickenson AH, Williams RJ, McMahon SB. Phoshatidylinositol 3-kinase is a key mediator of central sensitization in painful inflamatory conditions. *J Neurosci*, 2008., 28(16), 4261-70

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

Prescott SA, Ma Q, De Koninck Y. Normal and abnormal coding of somatosensory stimuli causing pain. *Nat Neurosci*, 2014., 17(2), 183-191

Rossetto O, Pirazzini M, Montecucco C. Botulinum neurotoxins:genetic, structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol*, 2014., 12(8), 535-49

Schiavo G, Santuccib A, Dasguptac BR, Mehtad PP, Jontesd J, Benefenati F, Wilsond MC, Montecuccoav C. Botulinurn neurotoxins serotypes A and E cleave SNAP-25 at distinct COOH-terminal peptide bonds. *FEBS Lett*, 1993., 355(1), 99-103

Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain.*, 1992., 51(1): 5-17

Tugnoli V, Capone J, Eleopra R, Quatrale R, Sensi M, Gastaldo E, Tola M, Geppetti P. Botulinum Toxin type A reduces capsaicin-evoked pain and neurogenic vasodilatation in human skin. *Pain*, 2007., 130(1-2), 76-83

Zhuo M. Ionotropic glutamate receptors contribute to pain transmission and chronic pain. *Neuropharmacology*, 2016., 112(Pt A), 228-234

7. SAŽETAK

Nedavne studije pokazuju da botulinum toksin tipa A (BT-A) potencijalno inhibira lučenje neurotransmitora boli iz centralnih primarnih aferentnih završetaka, uključujući glutamat. Prethodno je pokazano da periferno primijenjen BT-A i intratekalno primijenjen NMDA antagonist (AP5) imaju u kombinaciji aditivan antinociceptivni efekt. Cilj ovog istraživanja bio je proučiti potencijalne promjene u ekspresiji spinalnih glutamatnih receptora i PSD-95 proteina postdinaptičke gustoće, kao markera središnje senzitizacije uključenih u nastanak patološke boli.

Ipsilateralni dorzalni rogovi kontrolnih, netretiranih mužjaka Wistar štakora i štakora tretiranih s 5% formalinom (20 μL s.c. u stražnju šapu) prikupljeni su i homogenizirani za analizu ekspresije: a) NR1 i b) NR1 fosfo-Ser897 podjedinica NMDA recepora; c) GluR1 i d) GluR1 fosfo-Ser845 podjedinica AMPA receptora; i e) PSD-95 pomoću *western blot* metode. Skupine životinja tretirane formalinom dobile su fiziološku otopinu ili BT-A (5 U/kg, s.c. u stražnju šapu) pet dana i/ili AP5 (10μg/10μL, intratekalno) 10 minuta prije testa. Pokusi su odobreni u Ministarstvu poljoprivrede, Upravi za veterinarstvo i sigurnost hrane (dozvola br. EP 03-2/2015).

U usporedbi s netretiranim životinjama, ekspresija glutamatnih receptora i njihovih fosfoforiliranih oblika povećana je kod štakora tretiranih formalinom, što je u skladu s indukcijom upalne boli. Međutim, nije došlo do promjena u štakora tretiranih BT-A, AP-5 ili njihovom kombinacijom. Ekspresija PSD-95 proteina nepromijenjena je u svim skupinama. Prema tome, antinociceptivni učinak BT-A i/ili AP-5 nije praćen očekivanim smanjenjem ekspresije odabranih markera središnje senzitizacije.

S obzirom na to da mehanizam djelovanja BT-A uključuje inhibiciju lučenja neurotransmitora, posljedično smanjenje ekspresije receptora možda nije vidljivo u akutnom modelu boli i potrebno je daljnje istraživanje u kroničnom modelu boli, kao i ispitivanje učinka na vjerojatnije promjene razine glutamata.

SUMMARY

Recent studies suggest that botulinum toxin type A (BT-A) might inhibit the release of pain neurotransmitters from central primary afferent terminals, including glutamate. Previously we have demonstrated that peripheral BT-A and intrathecal NMDA antagonist (AP5) have an additive antinociceptive effect in combination. The aim of the present study was to investigate potential changes in the expression of spinal glutamate receptors and a membrane associated scaffolding protein in neural postsynaptic densities PSD-95, as markers of central sensitization involved in generation of pathological pain.

Ipsilateral dorsal horns from naïve and 5% formalin (20 µL s.c. into the hind paw) treated male Wistar rats were collected and homogenized to analyze the expression of: a) NR1 and b) NR1 phospho-Ser897 subunits of NMDA receptor; c) GluR1 and d) GluR1 phospho-Ser845 subunits of AMPA receptor; and e) PSD-95 by western blot. Formalin-treated groups received saline or BT-A (5 U/kg, s.c. into the hind paw) 5 days, and/or AP-5 (10 µg/10 µL, intrathecal) 10 min before the test. Experiments were approved by Croatian Ministry of Agriculture Veterinary and Food Safety Directorate (permit no. EP 03-2/2015).

Compared to naïve animals, the expression of glutamate receptors and their phosphorylated forms was increased in formalin-treated rats, which is in line with the induction of inflammatory pain. However, no changes were observed following the application of BT-A, AP5 or their combination. PSD-95 expression was unchanged across all groups. Therefore, the antinociceptive effect of BT-A and/or AP-5 was not accompanied by the expected reduction in selected central sensitization markers' expression.

Considering that BT-A's mechanism of action includes the inhibition of neurotransmitters' release, the consequent reduction of glutamate receptors may not be visible in acute pain model and should be investigated further in chronic pain model, together with the more probable effect on spinal glutamate level.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

SREDIŠNJE ANTINOCICEPTIVNO DJELOVANJE BOTULINUM TOKSINA A: ULOGA GLUTAMATNOG SUSTAVA?

BOJANA JANJANIN

SAŽETAK

Nedavne studije pokazuju da botulinum toksin tipa A (BT-A) potencijalno inhibira lučenje neurotransmitora boli iz centralnih primarnih aferentnih završetaka, uključujući glutamat. Prethodno je pokazano da periferno primijenjen BT-A i intratekalno primijenjen NMDA antagonist (AP5) imaju u kombinaciji aditivan antinociceptivni efekt. Cilj ovog istraživanja bio je proučiti potencijalne promjene u ekspresiji spinalnih glutamatnih receptora i PSD-95 proteina postdinaptičke gustoće, kao markera središnje senzitizacije uključenih u nastanak patološke boli. Ipsilateralni dorzalni rogovi kontrolnih, netretiranih mužjaka Wistar štakora i štakora tretiranih s 5% formalinom (20 µL s.c. u stražnju šapu) prikupljeni su i homogenizirani za analizu ekspresije: a) NR1 i b) NR1 fosfo-Ser897 podjedinica NMDA recepora; c) GluR1 i d) GluR1 fosfo-Ser845 podjedinica AMPA receptora; i e) PSD-95 pomoću *western blot* metode. Skupine životinja tretirane formalinom dobile su fiziološku otopinu ili BT-A (5 U/kg, s.c. u stražnju šapu) pet dana i/ili AP5 (10µg/10µL, intratekalno) 10 minuta prije testa. Pokusi su odobreni u Ministarstvu poljoprivrede, Upravi za veterinarstvo i sigurnost hrane (dozvola br. EP 03-2/2015). U usporedbi s netretiranim životinjama, ekspresija glutamatnih receptora i njihovih fosfoforiliranih oblika povećana je kod štakora tretiranih formalinom, što je u skladu s indukcijom upalne boli. Međutim, nije došlo do promjena u štakora tretiranih BT-A, AP-5 ili njihovom kombinacijom. Ekspresija PSD-95 proteina nepromijenjena je u svim skupinama. Prema tome, antinociceptivni učinak BT-A i/ili AP-5 nije praćen očekivanim smanjenjem ekspresije odabranih markera središnje senzitizacije. S obzirom na to da mehanizam djelovanja BT-A uključuje inhibiciju lučenja neurotransmitora, posljedično smanjenje ekspresije receptora možda nije vidljivo u akutnom modelu boli i potrebno je daljnje istraživanje u kroničnom modelu boli, kao i ispitivanje učinka na vjerojatnije promjene razine glutamata.

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

Rad sadrži:	31 stranicu, 7 grafičkih prikaza, 2 tablice i 38 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.
Ključne riječi:	botulinum toksin, bol, glutamat, Western blot
Mentor:	**Dr. sc. Višnja Drinovac Vlah**, *viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Ocjenjivači:	**Dr. sc. Višnja Drinovac Vlah**, *viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta* **Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.* **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2019.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

CENTRAL ANTINOCICEPTIVE EFFECT OF BOTULINUM TOXIN TYPE A: ROLE OF GLUTAMATE?

BOJANA JANJANIN

SUMMARY

Recent studies suggest that botulinum toxin type A (BT-A) might inhibit the release of pain neurotransmitters from central primary afferent terminals, including glutamate. Previously we have demonstrated that peripheral BT-A and intrathecal NMDA antagonist (AP5) have an additive antinociceptive effect in combination. The aim of the present study was to investigate potential changes in the expression of spinal glutamate receptors and a membrane associated scaffolding protein in neural postsynaptic densities PSD-95, as markers of central sensitization involved in generation of pathological pain. Ipsilateral dorsal horns from naïve and 5% formalin (20 µL s.c. into the hind paw) treated male Wistar rats were collected and homogenized to analyze the expression of: a) NR1 and b) NR1 phospho-Ser897 subunits of NMDA receptor; c) GluR1 and d) GluR1 phospho-Ser845 subunits of AMPA receptor; and e) PSD-95 by western blot. Formalin-treated groups received saline or BT-A (5 U/kg, s.c. into the hind paw) 5 days, and/or AP-5 (10 µg/10 µL, intrathecal) 10 min before the test. Experiments were approved by Croatian Ministry of Agriculture Veterinary and Food Safety Directorate (permit no. EP 03-2/2015). Compared to naïve animals, the expression of glutamate receptors and their phosphorylated forms was increased in formalin-treated rats, which is in line with the induction of inflammatory pain. However, no changes were observed following the application of BT-A, AP5 or their combination. PSD-95 expression was unchanged across all groups. Therefore, the antinociceptive effect of BT-A and/or AP-5 was not accompanied by the expected reduction in selected central sensitization markers' expression. Considering that BT-A's mechanism of action includes the inhibition of neurotransmitters' release, the consequent reduction of glutamate receptors may not be visible in acute pain model and should be investigated further in chronic pain model, together with the more probable effect on spinal glutamate level.

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

Thesis includes:	31 pages, 7 figures, 2 tables and 38 references. Original is in Croatian language.
Keywords:	botulinum toxin, pain, glutamate, Western blot
Mentor:	**Višnja Drinovac Vlah, Ph.D.** *Senior Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Reviewers:	**Višnja Drinovac Vlah, Ph.D.** *Senior Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry **Lidija Bach-Rojecky**, **Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry **Dubravka Vitali Čepo**, **Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
The thesis was accepted:	septmber 2019.