Antinociceptivno djelovanje botulinum toksina tipa A

Bach-Rojecky, Lidija

Doctoral thesis / Disertacija

2006

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:163:262229

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Lidija Bach-Rojecky

Antinociceptivno djelovanje botulinum toksina tipa A

DISERTACIJA

Zagreb, 2006.

Pokusi ove disertacije izvedeni su na Zavodu za farmakologiju i Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.
Imunohistokemijski pokusi izvodili su se u suradnji s prof. dr. sc. Marom Dominis s Odjela kliničke patologije KB Merkur.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Zdravko Lacković

Pokusi su financijski pomognuti od strane Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH (projekt prof. dr. sc. Z. Lacković i projekt prof. dr. sc. M. Relja), od strane DAAD-a suradnog projekta Wuerzburg - Zagreb - Rijeka - Tuzla - Sarajevo - Mostar (Antinociceptive activity of botulinum toxin type A: new mechanism of action, new indications?, voditelji: prof. dr. sc. Zdravko Lacković i prof. dr. sc. Maja Relja) i Njemačke rektorske konferencije, te se ovim putem zahvaljujem voditeljima projekata i prof. dr. sc. Peteru Riedereru iz Wuerzburga, kao njemačkom voditelju projekta.

U pisanju ove disertacije pokušali smo se voditi uputama Deklaracije Europske konferencije o harmonizaciji doktorskih studija u području Biomedicine i zdravstva („Zagrebačka deklaracija“ iz 2004. godine).

Zahvaljujem se svom mentoru prof. dr. sc. Z. Lackoviću na pruženoj pomoći, iskazanoj dobroj volji, strpljenju, spremnosti na razgovor i velikom razumijevanju. Zahvaljujem se prof. dr. sc. M. Dominis na suradnji i korisnim savjetima prilikom provođenja imunohistokemijskih pokusa. Velika zahvala tehničkoj suradnici, gdji Božici Hržan na pomoći pri izvođenju pokusa. Bez nje bi sve bilo puno teže. Zahvaljujem se svima koji su mi davali podršku tijekom izrade ove disertacije, posebno Dekanu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta prof. dr. sc. Ivanu Jalšenjaku, svojim suradnicima sa Zavoda za farmakologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, kao i djelatnicima Zavoda za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji na strpljenju, razumijevanju i podršci tijekom svih ovih godina koji mi čine život ljepšim i zbog njih sve ovo ima smisla.

SADRŽAJ

Kratice

1. UVOD
1.1. Botulinum toksin 1
1.1.1. Struktura botulinum toksina tipa A 1
1.1.2. Mehanizam djelovanja botulinum toksina tipa A na živčano-mišićnoj spojnici 1
1.1.3. Klinička primjena botulinum toksina 3

1.2. Patofiziologija boli 5
1.2.1. Osjetni receptori 5
1.2.2. Primarni aferentni živci 7
1.2.3. Neuronalna plastičnost 9
1.2.4. Neurotransmitori pri nocicepciji 9
1.2.5. Modulacija nocicepcije 10
1.2.6. Etiološka podioba boli 10
1.2.7. Senzitizacija i mehanizmi nastanka 14
1.2.8. Hiperalgezija i alodinija 16
1.2.9. Liječenje boli 17

1.3. Botulinum toksin tipa A i bol 19
1.3.1. Klinička ispitivanja antinociceptivnog djelovanja botulinum toksina tipa A 19
1.3.2. Pretklinička ispitivanja antinociceptivnog djelovanja botulinum toksina tipa A 21
1.3.3. Mehanizam antinociceptivnog djelovanja botulinum toksina tipa A 24

2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA 26

3. MATERIJALI I METODE
3.1. Životinje 27
3.2. Ispitivana supstancija - botulinum toksin tipa A 27
3.2.1. Primjena botulinum toksina tipa A 27
3.2.1.1. Periferna primjena 27
3.2.1.2. Intratekalna primjena 27
3.2.1.3. Intraneuronalna primjena 27
3.3. Korištene kemikalije, reagensi i antitijela 28
3.4. Eksperimentalni modeli boli 29
3.4.1. Akutna osjetljivost na termalni podražaj - metoda vruće ploče 29
3.4.2. Akutna osjetljivost na mehanički podražaj - metoda pritiska šape 29
3.4.3. Formalinski test 30
3.4.4. Hiperalgezija uzrokovana karagenanom 30
3.4.5. Hiperalgezija uzrokovana kapsaicinom 31
3.4.6. Periferna neuropatija 32
3.4.7. Dijabetička neuropatija 32
3.4.8. Kronična mišićna hiperalgezija 33
3.5. Određivanje veličine edema šape nakon injiciranja karagenana 33

3.6. Mjerenje ekstravazacije proteina nakon injiciranja upalnih tvari u šapu štakora 34
3.7. Određivanje djelovanja botulinum toksina tipa A nakon inhibicije aksonalnog transporta 34
3.7.1. Inhibicija aksonalnog transporta kolhicinom 34
3.7.2. Inhibicija aksonalnog transporta presijecanjem *n. ishiadicusa* 35
3.8. Metode imunodetekcije botulinum toksina tipa A 35
3.8.1. Priprema uzoraka uza imunodetekciju 35
3.8.2. Imunohistokemija 36
3.8.3. Western blot metoda 37
3.9. Statistička obrada rezultata 38

4. REZULTATI
4.1. Djelovanje botulinum toksina tipa A na različite vrste boli 39
4.1.1. Nociceptivna bol 39
4.1.2. Upalna bol 39
4.1.2.1. Formalinski test 39
4.1.2.2.Hiperalgezija uzrokovana karagenanom i kapsaicinom 41
4.1.3. Neuropatska bol 43
4.1.3.1. Periferna neuropatija
43
4.1.3.2. Dijabetička neuropatija 45
4.2. Utjecaj botulinum toksina tipa A na upalu 48
4.2.1. Lokalna upala uzrokovana karagenanom 48
4.2.2 Ekstravazacija proteina uzrokovana karagenanom i kapsaicinom 49
4.3. Središnje mjesto antinociceptivnog djelovanja botulinum toksina tipa A 51
4.3.1. Antinociceptivno djelovanje botulinum toksina tipa A nakon intratekalne primjene 51
4.3.1.1. Formalinski test 51
4.3.1.2. Periferna neuropatija 52
4.3.2. Djelovanje botulinum toksina tipa A nakon blokade aksonalnog transporta kolhicinom 53
4.3.3. Imunohistokemija 55
4.3.4. Western blot metoda 57
4.4. Djelovanje botulinum toksina tipa A na sekundarnu mehaničku hiperalgeziju 58
4.4.1. Utjecaj botulinum toksina tipa A na kroničnu mišićnu hiperalgeziju 58
4.4.1.1. Periferna primjena botulinum toksina tipa A 58
4.4.1.2. Primjena botulinum toksina tipa A u n. ishiadicus 59
4.4.2. Utjecaj botulinum toksina tipa A na hiperalgeziju na kontralateralnoj strani nakon inhibicije aksonalnog transporta 61
4.4.2.1. Inhibicija aksonalnog transporta botulinum toksina tipa A kolhicinom 61
4.4.2.2. Inhibicija aksonalnog transporta botulinum toksina tipa A transekcijom n. ishiadicusa *62*

5. RASPRAVA
5.1. Utjecaj botulinum toksina tipa A na različite vrste boli 63

5.1.1. Nociceptivna bol 63
5.1.2. Upalna bol 64
5.1.3. Neuropatska bol 65
5.2. Učinci botulinum toksina tipa A na edem i ekstravazaciju proteina pri upali 66
5.3. Središnje mjesto djelovanja botulinum toksina tipa A 67
5.3.1. Intratekalna primjena botulinum toksina tipa A 67
5.3.2. Inhibicija aksonalnog transporta botulinum toksina tipa A 67
5.3.3. Metode imunodetekcije botulinum toksina tipa A 68
5.3.4. Kronična bilateralna mišićna hiperalgezija 69

6. ZAKLJUČCI 71

7. SAŽETAK 73

8. SUMMARY 74

9. LITERATURA 75

10. ŽIVOTOPIS 83

Prilozi - Objavljeni znanstveni radovi vezani uz problematiku disertacije:

I. Bach-Rojecky L, Relja M, Lackovic Z, Botulinum toxin type A in pain management. U: Battistin L (ur) 7th Congress of the European Society for Clinical Neuropharmacology Trieste, 2004. MEDIMOND, Monduzzi Editore, International Proceedings, Bologna, pp.185-90.

II. Bach-Rojecky L, Relja M, Lacković Z. Botulinum toxin type A in experimental neuropathic pain. J Neural Transm 2005;112:215-9.

III. Bach-Rojecky L, Lacković Z. Antinociceptive effect of botulinum toxin type A in rat model of the carrageenan and capsaicin induced pain. Croat Med J 2005;46:201-8.

Kratice

AMPA	- α-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kiselina (*engl.* α-**A**mino-3-hydroxy-5-**M**ethyl-4-isoxazole**P**ropionic **A**cid)
ASIC	- na kiselinu osjetljivi ionski kanali (*engl*. **A**cid **S**ensing **I**on **C**hannel)
ATP	- adenozin trifosfat (*engl*. **A**denosine **T**ri**P**hosphate)
BK	- **B**radi**K**inin
BT-A	- **B**otulinum **T**oksin tipa **A**
CGRP	- peptid srodan genu za kalcitonin (*engl.* **C**alcitonin **G**ene **R**elated **P**eptide)
COX_2	- ciklooksigenaza $_2$ (*engl.* **C**yclo**OX**igenase)
CRF	- faktor lučenja kortikotropina (*engl.* **C**orticotrophin **R**eleasing **F**actor)
GABA	- gama-amino maslačna kiselina (*engl*. **G**amma-**A**mino **B**utyric **A**cid)
5-HT	- serotonin (5-**H**idroksi**T**riptamin)
IASP	- *engl*. **I**nternational **A**ssociation for **S**tudy of **P**ain
i.j.	- **I**nternacionalna **J**edinica
i.m.	- **I**ntra**M**uskularno
i.p.	- **I**ntra**P**eritonealno
NK	- **N**euro**K**inin
NMDA	- **N**-**M**etil-**D**-**A**spartat receptor
NO	- dušik-2-oksid (*engl.* **N**itric **O**xid)
NSAIL	- **N**e**S**teroidni **A**nti**I**nflamatorni **L**ijekovi
PGE_2	- **P**rosta**G**landin tipa **E_2**
SDS-PAGE	- *engl.* **S**odium **D**odecyl **S**ulphate-**P**oly**A**crilamide **G**el **E**lectrophoresis
SNAP-25	- *engl.* **S**y**N**aptosomal **A**ssociated **P**rotein **25** kDa
SNARE	- *engl.* **S**oluble **N**-ethylmaleimide-sensitive factor **A**ttachment protein **R**eceptor
s.c.	- subkutano (*engl*. **S**ub**C**utaneous)
SP	- **S**upstanca **P**
SŽS	- **S**redišnji **Ž**ivčani **S**ustav
TBS	- *engl*. **T**ris **B**uffered **S**aline
TRPV1	- vaniloidni receptor $_1$ (*engl*. **T**ransient **R**eceptor **P**otential cation channel, subfamily **V**alliloid)
VIP	- **V**azoaktivni **I**ntestinalni **P**eptid

1. UVOD

1.1. Botulinum toksin

Clostridium botulinum je gram pozitivna sporogena bakterija koja u anaerobnim uvjetima prelazi u vegetativni oblik, u čijem se citosolu stvara sedam različitih serotipova neurotoksina: tip A, B, C1, D, E, F i G. Ovi toksini djeluju specifično na perifernim kolinergičnim živčanim završecima, gdje priječe egzocitozu acetilkolina iz presinaptičkog neurona (1). Trovanje botulinum neurotoksinima uzrokuje botulizam, pri čemu se procjenjuje da je letalna količina kristaliničnog botulinum toksina tipa A (BT-A) oko 70 μg kod peroralnog unošenja, 0,09-0,15 μg uslijed intravenske i intramuskularne primjene, odnosno 0,70-0,90 μg ako se inhalira, što ga čini najpotentnijim otrovom u prirodi i zbog čega predstavlja prijetnju kao potencijalno bojno oružje (2). Usprkos tome, u nanogramskim količinama pročišćeni toksin se klinički primjenjuje u terapiji različitih stanja karakteriziranih povećanom mišićnom kontrakcijom, pri čemu lokalno injiciranje u mišiće dovodi do dugotrajne paralize.

1.1.1. Struktura botulinum toksina tipa A

BT-A se stvara kao kompleks od 900 kDa, a čini ga neurotoksična - biološki aktivna komponenta veličine 150 kDa i netoksični proteini. Netoksični proteini nisu fiziološki aktivni, već se smatra da štite biološki aktivni dio molekule od proteolize i denaturacije pri visokoj temperaturi ili kiselom pH, primjerice u probavnom sustavu prilikom peroralnog trovanja toksinom. Biološki aktivni dio molekule oblikuju dva lanca povezana disulfidnom vezom, a čini ga 1296 aminokiselina (1). Dugi lanac, veličine oko 100 kDa, odgovoran je za vezanje neurotoksina za presinaptičke membrane, dok kratki lanac (50 kDa) posjeduje endopeptidaznu aktivnost i specifično cijepa ključne proteine u procesu vezanja sinaptičkih mjehurića s membranom (3). Trodimenzionalna struktura pokazuje da se BT-A sastoji od tri domene, veličine oko 50 kDa, pri čemu je jedna odgovorna za vezanje neurotoksina za membranu, druga omogućuje ulazak toksina u stanicu, dok je treća aktivna i posjeduje endopeptidaznu aktivnost (4).

1.1.2. Mehanizam djelovanja botulinum toksina tipa A na živčano-mišićnoj spojnici

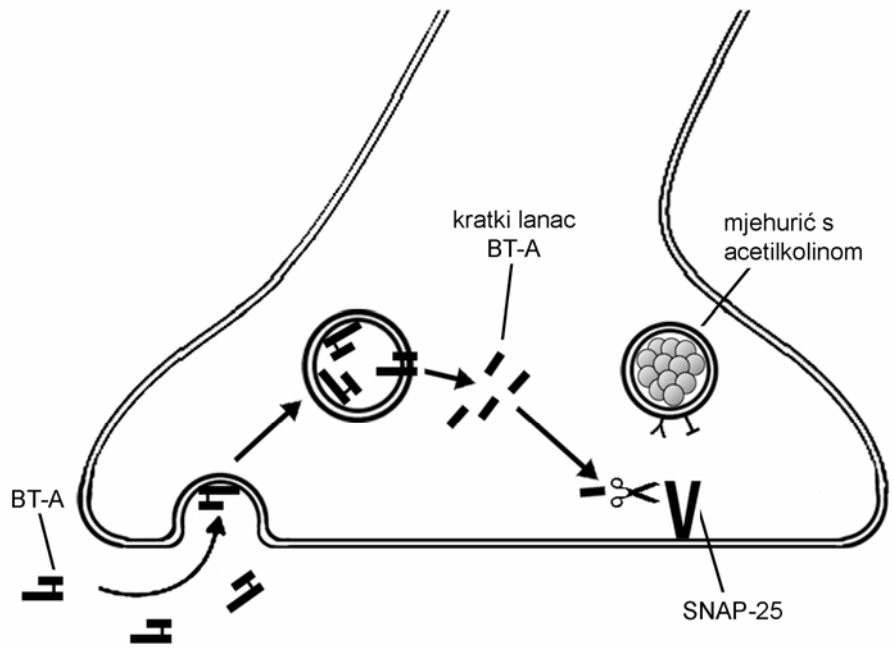
Intoksikacija s BT-A može se opisati u nekoliko koraka (Slika 1) (5,6):

(1) Prvi je korak **vezanje toksina** za akceptore na membranama. Unatoč brojnim istraživanjima potencijalnih veznih mjesta na presinaptičkim membranama, ona do danas nisu identificirana. Predložen je model dvostrukog receptora, gdje se pretpostavlja da se dugi lanac sastoji od dvije pod-domene, od kojih se jedna veže za glikoproteine, dok se druga domena veže za poligangliozide u staničnoj membrani.

(2) Nakon specifičnog vezanja, slijede procesi **internalizacije i translokacije toksina** u citosol. Proces translokacije započinje promjenama u strukturi toksina pod utjecajem kiselog pH, nakon čega slijedi ugradnja toksina u membranu endosoma, translokacija kratkog lanca s luminalne na citosolnu površinu membrane endosoma, redukcija disulfidne veze, te konačno odvajanje kratkog od dugog lanca.

(3) Kratki lanac je specifična, o cinku-ovisna, endoproteaza koja cijepa jedan ili više proteina ključnih u procesu egzocitoze neurotransmitora. SNAP-25 (**S**y**N**aptosomal

Associated **P**rotein veličine 25 kDa), sinaptobrevin i sintaksini se zajedničkim imenom zovu SNARE (**S**oluble **N**-ethylmaleimid fusion protein **A**ttachement Protein (SNAP) **R**eceptor) proteinima, a omogućuju fuziju membrana sinaptičkog mjehurića i presinaptičke membrane neurona (7). Iako svi inhibiraju lučenje acetilkolina iz živčanih završetaka, pojedini serotipovi botulinum neurotoksina razlikuju se po intracelularnim ciljnim proteinima koje cijepaju, po karakteristikama djelovanja, te prema potentnosti. Osim BT-A, SNAP-25 cijepaju i BT-C1 i BT-E, serotipovi B, D, F i G cijepaju sinaptobrevin ili VAMP (**V**esicule-**A**ssociated **M**embrane **P**rotein), a tip C1 cijepa i sintaksine. Djelovanje BT-A i C1 na živčano-mišićnoj spojnici je najdulje (u ljudi 4-6 mjeseci), a BT-E najkraće (u ljudi 4-6 tjedana) (8).



Slika 1. ***Mehanizam djelovanja botulinum toksina tipa A*** *(modificirano prema ref. 1)*
Nakon vezanja za specifične akceptore na membranama neurona, za što je vjerojatno odgovoran dugi lanac, slijedi internalizacija i translokacija biološki aktivnog kratkog lanca BT-A u citosol, koji cijepa SNAP-25 protein i tako sprječava egzocitozu acetilkolina.

Uslijed injiciranja malih količina toksina u mišić, živčano-mišićna spojnica oko mjesta injiciranja postaje paralizirana i gubi funkcionalnost. Injicirani mišić i mišićna vlakna postepeno atrofiraju, dok se motorna ploča povećava. Dolazi do stvaranja novih ogranaka živaca koji sadrže proteine uključene u proces neuroegzocitoze, preuzimajući funkciju zahvaćene motorne ploče (6). Remodeliranje motorne ploče započinje stvaranjem kratkih ogranaka, i to već 4 dana nakon intramuskularnog injiciranja BT-A. Ogranci se u sljedeća 4 tjedna postepeno povećavaju, protežući se paralelno s longitudinalnom osi mišićnog vlakna i preuzimaju funkciju egzocitoze acetilkolina. Na postsinaptičkim membranama također dolazi do reorganizacije nikotinskih receptora, koji su sada smješteni nasuprot novostvorenim funkcionalnim ograncima. Pritom se povećava broj motornih ploča na

jednom mišićnom vlaknu, kao i broj vlakana inerviranih jednim motornim aksonom (9). Postepeno vraćanje funkcije neuroegzocitoze glavnom ogranku primijećeno je tek nakon 2 mjeseca od injiciranja BT-A, da bi se potpuno oporavilo nakon sljedećih mjesec dana.

O mehanizmima i molekularnim medijatorima sinaptičke plastičnosti se još uvijek premalo zna, a pretpostavlja se da su u regulaciju uključeni različiti proteini koji posreduju unutarstanične interakcije tijekom formiranja, sazrijevanja i održavanja živčano-mišićne spojnice.

Iako postoji više pretpostavki, kao što su dugotrajno zadržavanje aktivnih proteolitičkih jedinica BT-A u neuronu (10) ili nefunkcionalnost SNAP-25 fragmenata nastalih cijepanjem (11), još uvijek nema konačnog objašnjenja duljine djelovanja botulinum toksina, koja je glavni razlog njegove kliničke primjene. Za sada, nije moguće objasniti niti prestanak djelovanja, tj. sudbinu biološki aktivnog kratkog lanca BT-A u presinaptičkoj stanici. Mogućnosti, kao što su transport kratkog lanca duž aksona ili njegova moguća proteoliza u citosolu ili lizosomima, zahtijevaju dodatna istraživanja.

1.1.3. Klinička primjena botulinum toksina

Od svih sedam serotipova botulinum toksina, za sada se u terapiji koriste samo dva, i to tip A (Botox®, Botox® Cosmetic, Allergan, SAD; Dysport®, Ipsen, Velika Britanija; Xeomin®, Merz, Njemačka), i tip B (Myoblock®, Elan Pharmaceuticals, SAD). Potentnost im je izražena u internacionalnim jedinicama (i.j.), pri čemu jedna jedinica odgovara količini toksina koja nakon intraperitonealne primjene prouzroči smrt 50% miševa (12) (1 i.j. Botox®-a odgovara 0,048 ng BT-A).

Razlike između BT-A i BT-B postoje u potentnosti, trajanju djelovanja, učestalosti nuspojava i antigenosti. Dok djelovanje BT-B (Myoblock®) nastupa prije, ono traje kraće, uz više zabilježenih nuspojava, a potrebne su i do nekoliko puta veće doze od doza BT-A (13). Međutim, razlike postoje i između različitih komercijalnih pripravaka BT-A. Tako jednoj jedinici Botox®-a po potentnosti odgovaraju 3-4 jedinice Dysport®-a. Za razliku od ova dva komercijalna pripravka koji sadrže BT-A u obliku kompleksa veličine 900 kDa, najnoviji pripravak Xeomin® sadrži samo biološki aktivni dio BT-A veličine 150 kDa.

Terapijska primjena BT-A odobrena je 1989. godine od Američke agencije za hranu i lijekove (FDA - Food and Drug Administration) najprije za liječenje strabizma, blefarospazma i hemifacijalnog spazma, da bi se 2000. godine proširila primjena na cervikalnu distoniju, te dječju cerebralnu paralizu i spasticitet mišića različite etiologije (12). Štoviše, 2002. godine odobrena je primjena toksina u kozmetičke svrhe za tretiranje bora, čime je botulinum toksin postao poznat i najširoj javnosti. Danas je primjena BT-A odobrena i kod poremećaja autonomnog živčanog sustava, i to kod primarne aksilarne hiperhidroze (12) (Tablica 1).

Tablica 1. *Terapijska primjena BT-A (odobrena i u fazi ispitivanja) u poremećaja karakteriziranih povećanom mišićnom kontrakcijom i poremećaja autonomnog živčanog sustava*

Odobrena	**Ref.**
Fokalne distonije: *blefarospazam*	14
cervikalna distonija	15
Hemifacijalni spazam	16
Strabizam	17
Kozmetička primjena – bore	18
Dječja cerebralna paraliza	19
Autonomni poremećaji: *primarna aksilarna hiperhidroza*	20
U fazi ispitivanja	
Ostale fokalne distonije: *laringealna*	21
profesionalne	22
Esencijalni tremor ruku i glave	23
Multipla skleroza	24
Autonomni poremećaji: *fokalna hiperhidroza*	25
hipersalivacija	26
hiperlakrimacija	27
Freyev sindrom	28
Gastrointestinalni poremećaji: *ahalazija*	29
analne fisure	30
disinergija mišića zdjelice	31
Urološki poremećaji: *neurogena hiperreaktivnost mjehura*	32
benigna hiperplazija prostate	33

Tijekom posljednjih godina, povećava se broj nalaza o povoljnom djelovanju BT-A kod različitih bolnih stanja koja prate spasticitet, ali i u boli koje nisu praćene povećanom mišićnom kontrakcijom.

1.2. Patofiziologija boli

Bol je „...neugodno senzorno i emocionalno iskustvo povezano sa stvarnom ili mogućom ozljedom tkiva...“ (IASP - International Association for Study of Pain), koja ne uključuje samo prijenos različitih nociceptivnih (bolnih) informacija, već i njihovu emocionalnu i kognitivnu obradu u mozgu.

Za razliku od drugih somatosenzornih modaliteta koji se adaptiraju i slabe uslijed ponavljanja podražaja, osjet boli se pojačava. Bol može biti rano upozorenje koje štiti organizam od moguće ozljede i pokreće određene odgovore, te je kao takva neophodna za preživljavanje organizma u okolišu. Pojačanje boli uslijed ponavljanja predstavlja i upozorenje o rastućoj opasnosti od oštećenja tkiva i organizma.

Bol može biti i patološka (na primjer, uslijed ozljede ili disfunkcije živčanog sustava), kroničnog trajanja te više nema funkciju svrsishodnog upozorenja, već sama može oštetiti funkcioniranje, pa i život organizma.

Različiti složeni molekularni i stanični mehanizmi unutar perifernog i/ili središnjeg živčanog sustava (SŽS-a) pridonose nastanku i trajanju boli. Usprkos intenzivnim istraživanjima neurobiologije i patofiziologije boli, za neka bolna stanja još uvijek nisu poznati mehanizmi nastanka.

Svi postojeći lijekovi koji se koriste u liječenju boli djeluju kratkotrajno i, unatoč različitim terapijskim pristupima, teško mogu patnju bolesnika ukloniti jednoliko i tijekom duljeg vremena.

1.2.1. Osjetni receptori

Somatosenzorički sustav prenosi informacije iz osjetnih receptorskih organa u koži, mišićima, zglobovima i unutarnjim organima u SŽS putem primarnih aferentnih neurona. Među osjetne informacije koje prenosi somatosenzorički sustav, ubrajaju se: mehanički osjeti, poput dodira i tlaka, treperenja i vibracije; toplinski osjeti (toplo i hladno); osjet boli; osjet položaja i zglobnih pokreta (propriocepcija) i osjet visceralnog istezanja (Tablica 2).

Mehanoreceptori reagiraju na mehaničke podražaje, poput glađenja ili udubljivanja kože, pritiska, pokreta, treperenja, a mogu se adaptirati sporo (Merkelovi i Ruffinijevi završeci) ili brzo (Meissnerova i Pacinijeva tjelešca). Većinu aksona koji opskrbljuju mehanoreceptore čine mijelinizirana Aβ-vlakna velike brzine provođenja podražaja (Tablica 2).

Termoreceptori za hladno i toplo adaptiraju se sporo, a izvješćuju o temperaturi kože. Receptori za toplo ne mogu izvještavati o boli uzrokovanoj toplinom, budući da prestaju prenositi podražaje (izbijati) kada temperatura prijeđe granicu oštećenja tkiva (~ 45 °C). Većinu receptora za hladno opskrbljuju mijelinizirana Aδ-vlakna koja brzo provode podražaje, a receptore za toplo nemijelinizirana C-vlakna male brzine provođenja (Tablica 2).

Nociceptori su prisutni u većini tkiva, uključujući kožu, mišiće, unutarnje organe, krvne žile i kosti, a reagiraju na podražaje koji mogu uzrokovati oštećenje tkiva (35). Morfološki, za razliku od mehanoreceptora, oni su gole živčane okončine, tj. nisu obavijeni staničnom

kapsulom koja bi ih štitila od djelovanja različitih kemijskih tvari izlučenih ili primijenjenih u kožu.

Nociceptori u koži se, prema vrsti podražaja na koji reagiraju, dijele u dvije skupine (Tablica 2):
1. Aδ-mehaničke, koji odgovaraju na mehaničke podražaje jakog intenziteta (ubadanje i gnječenje kože) i
2. C-polimodalne, koji reagiraju na različite vrste štetnih podražaja (mehaničke, toplinske, kemijske).

Ovi se receptori razlikuju od ostalih mehanoreceptora i termoreceptora po visokom pragu podražaja. Njih, u fiziološkim uvjetima, aktiviraju samo podražaji visokog intenziteta.

Iznimno, u slučaju oštećenja tkiva ili živca, nociceptori se mogu aktivirati podražajima nižeg intenziteta i različitim tvarima iz drugih izvora (vidi kasnije).

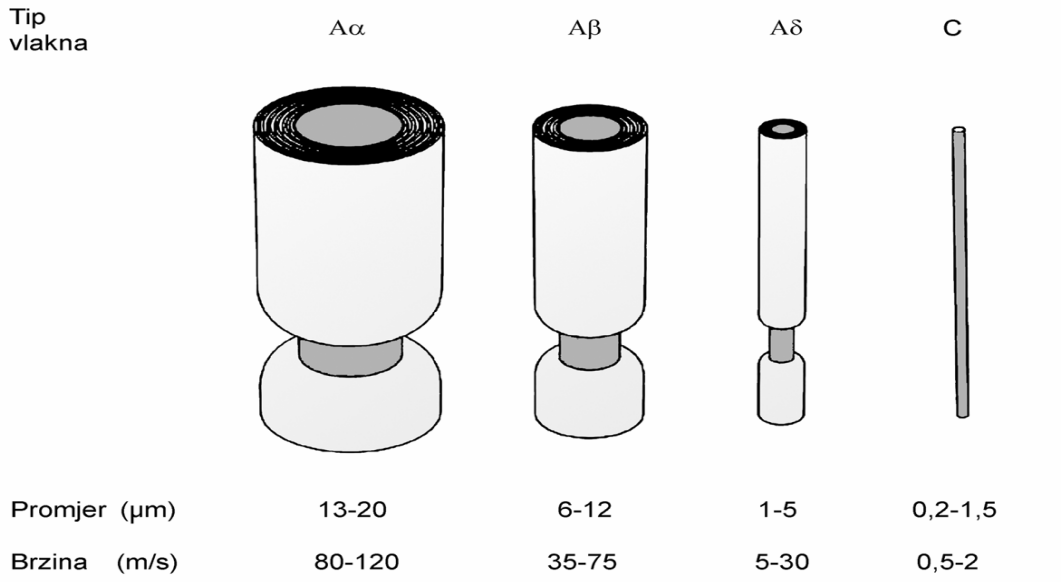
Tablica 2. *Osobine (modalitet, podmodalitet, receptor, tip vlakna, brzina provođenja, vrsta podražaja) osjetnih receptora (prema ref. 34)*

Modalitet	Podmodalitet	Receptor	Tip vlakna	Brzina provođenja (m/s)	Vrsta podražaja
Mehanoreceptori	Sporo adaptirajući tip I	Merkelovi završeci	Aβ	42-72	Pritisak, oblik, tekstura
	Sporo adaptirajući tip II	Ruffinijevi završeci	Aβ	42-72	Moguće rastezanje kože
	Brzo adaptirajući	Meissnerova tjelešca	Aβ	42-72	Treperenje, Pokret
	Brzo adaptirajući	Pacinijeva tjelešca	Aβ	42-72	Vibracija
Termoreceptori	Toplo	Živčani završeci	C	0,5-1,2	Toplina
	Hladno	Živčani završeci	Aδ	12-36	Hladnoća
Nociceptori	Mijelinizirana	Živčani završeci	Aδ	12-36	Oštra bol
	Nemijelinizirana	Živčani završeci	C	0,5-1,2	Tupa difuzna bol
Proprioceptori	Aferentna vlakna iz zgloba	Živčani završeci slični Ruffinijevim i Pacinijevim tjelešcima	Aβ	42-72	Protektivna uloga protiv hiperekstenzije
	Golgijevi tetivni organi	Golgijevi završeci	Aα	72-120	Tenzija mišića
	Mišićna vretena	Tip I	Aα	72-120	Dužina mišića
		Tip II	Aβ	42-72	Dužina mišića
		Ruffinijeva tjelešca	Aβ	42-72	Zglobni pokreti

Proprioceptori daju informacije o zglobnim pokretima, dužini i tenziji mišića, tj. o položaju tijela u prostoru. Tri su podskupine proprioceptora: živčani završeci u zglobovima, Golgijevi završeci u Golgijevim tetivnim tkivima i skupine receptora iz mišićnog vretena (34). Sve receptore opskrbljuju debela mijelinizirana vlakna (Aα i Aβ) velike brzine provođenja impulsa (Tablica 2).

1.2.2. Primarni aferentni živci

Periferna aferentna vlakna iz kože i drugih organa se razlikuju po morfologiji, brzini provođenja i funkciji njihovih terminalnih receptora (35) (Slika 2).



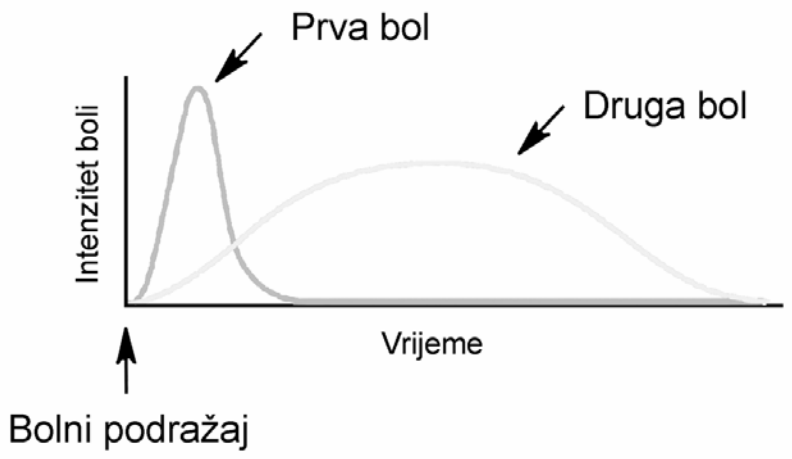
Slika 2. ***Osobine perifernih aferentnih vlakana koja opskrbljuju osjetne receptore*** *(modificirano prema www.bioon.com/book/biology/whole/html/chapter 12.ht). Aα-vlakna su mijelinizirana vlakna velike brzine provođenja impulsa. Ona provode impulse porijeklom iz mišićnog vretena. Sudjeluju u brzom prijenosu informacija između mišića i kralješnične moždine. Primarna Aβ-vlakna su mijelinizirana vlakna velikog promjera, a njihova stimulacija u koži, mišićima ili zglobovima ne uzrokuje bol. Dva su tipa Aδ-vlakana. Tip I Aδ-vlakana odgovara na jaki termalni podražaj (~ 52 °C) i nije osjetljiv na kapsaicin, dok tip II Aδ-vlakana, kao i C-vlakna, reagiraju na srednje jaki termalni podražaj (~ 45 °C) i kapsaicin. Većina C-vlakana su polimodalni receptori osjetljivi na bolne termalne, mehaničke i kemijske podražaje.*

Impulsi se od osjetnih receptora prenose u SŽS primarnim aferentnim aksonima (periferna grana), čija su tijela u ganglijima dorzalnih korjenova. Središnja grana primarnih aferentnih živaca ulazi u kralješničnu moždinu, gdje se aktiviraju naredni neuroni osjetnog sustava. Morfološki i funkcionalno, dva su glavna tipa senzornih stanica u ganglijima

dorzalnih korjenova: male, promjera 10-30 μm, čiji su aksoni nemijelinizirana C-vlakna i velike, promjera 40-70 μm, čiji su aksoni mijelinizirana vlakna velike brzine provođenja impulsa. Većina perifernih grana malih stanica su termoreceptori, mehanoreceptori i nociceptori, dok su grane stanica većeg promjera mehanoreceptori niskog praga podražaja (36).

C-nociceptore opskrbljuju nemijelinizirana vlakna male brzine provođenja (0,5-1,2 m/s), dok Aδ-mehaničke nociceptore opskrbljuju fina aferentna mijelinizirana vlakna veće brzine provođenja akcijskih potencijala (12-36 m/s).

Zbog različite brzine provođenja aferentnih vlakana iz kože, kutana bol je karakterizirana dvjema fazama (Slika 3).



Slika 3. ***Dvije faze kutane boli*** *(modificirano prema ref. 35): prva faza (prva bol) je posljedica aktivacije mijeliniziranih Aδ-vlakan, te nastupa brzo, traje kratko, visokog je intenziteta („oštra") i dobro je lokalizirana; druga faza (druga bol) je posljedica aktivacije nemijeliniziranih C-vlakana, nastupa sporije, traje dulje, slabijeg je intenziteta („tupa") i loše je lokalizirana.*

Većina C i Aδ nociceptora iz unutarnjih organa, za razliku od onih u koži, neosjetljivi su na bolne podražaje u normalnim (fiziološkim) uvjetima, odnosno u neozlijeđenom, neupaljenom tkivu. Aktiviraju se tek upalnim medijatorima i postaju osjetljivi na mehaničke podražaje. Njihova je gustoća, u usporedbi s gustoćom nociceptora u koži, relativno mala, pa se čini da je to jedan od uzroka difuzne i slabo lokalizirane prirode visceralne boli (37).

Većina nociceptivnih vlakana koji inerviraju mišić su mala mijelinizirana vlakna grupe III (odgovaraju kutanim Aδ-vlaknima) i nemijelinizirana vlakna grupe IV (odgovaraju kutanim C-vlaknima). Vlakna grupe III odgovaraju na rastezanje i kontrakciju mišića, te pritisak koji nije bolan. Vlakna grupe IV mogu odgovarati na termalni podražaj, kao i na ishemiju/hipoksiju i lokalizirano povećanje pritiska na mišić (38). Za razliku od boli porijeklom iz kože, mišićna je bol karakterizirana, bez obzira na vremenski tijek, kao tupa i grčevita.

1.2.3. Neuronalna plastičnost

Senzorni se neuroni, pod utjecajem različitih vanjskih utjecaja, mogu mijenjati funkcionalno, strukturalno, kemijski (39). Pritom se modificira njihova provodljivost. Na primjer, stimulacija Aβ-vlakna nakon ozljede živca može uzrokovati bol. Osim toga, neuroni se mogu senzitizirati, pri čemu se njihova osjetljivost na različite podražaje značajno mijenja. U nekim patološkim stanjima neuroni mogu stvarati sinapse s neuronima s kojima u normalnim uvjetima nisu u kontaktu (inervacija neurona u lamini II kralješnične moždine Aβ-vlaknima). Mehanizmi i značenje ovakvih promjena za patofiziologiju različitih vrsta boli biti će opisana kasnije u tekstu (vidi kasnije: Senzitizacija i mehanizmi nastanka).

1.2.4. Neurotransmitori pri nocicepciji

Glutamat je glavni ekscitacijski neurotransmitor u svim neuronima u osjetnom putu. Djeluje ekscitacijski preko ionotropnih AMPA (AMPA - α-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kiselina) i NMDA (NMDA - N-metil-D-aspartat) receptora na perifernim okončinama aferentnih živaca (40), neuronima dorzalnog roga kralješnične moždine i neuronima u talamusu (41). U fiziološkim uvjetima glutamat se luči na periferiji, prilikom aktivacije nociceptora termalnim podražajem ili primjenom kapsaicina, te preko receptora na primarnim aferentnim završecima nemijeliniziranih C-vlakana doprinosi nocicepciji (42) (v. kasnije: Nociceptivna bol). Pri upali se pojačano izlučuje iz nociceptora, ali i iz okolnih dermalnih/epidermalnih stanica, makrofaga ili Schwannovih stanica (40) i doprinosi povećanoj podražljivosti neurona. Pri upali se periferno, osim glutamata, oslobađaju i neuropeptidi: supstanca P (SP) i peptid srodan genu za kalcitonin (CGRP) koji imaju važne autokrine i parakrine učinke (43,44,45).

Osim postsinaptički, djelovanje glutamata u dorzalnom rogu kralješnične moždine može biti i na presinaptičke NMDA receptore na membranama središnjih grana aferentnog senzornog vlakna. Posljedica toga je dodatno povećanje lučenja neurotransmitora u središnje sinapse (41).

Više neurotransmitora je različito kolokalizirano u aferentnim živčanim završecima, a ovisno o porijeklu živčanog završetka (koža, unutarnji organ, mišić), tipu nociceptora (C-vlakna *vs.* Aβ-vlakna) i dr. Od važnosti u transmisiji bolnih impulsa mogu biti: SP i drugi tahikinini, CGRP, somatostatin, faktor lučenja kortikotropina (CRF), kolecistokinin, galanin, vazoaktivni intestinalni peptid (VIP). Oni se oslobađaju iz središnjih okončina aferentnog senzornog vlakna. I mnogi drugi medijatori iz ne-živčanih izvora u dorzalnom rogu kralješnične moždine, poput adenozin tri-fosfata (ATP-a), dušik-2-oksida (NO), prostaglandina i različitih neurotropina, mogu djelovati sinergistički povećavajući transmisiju ili mogu djelovati inhibicijski (41).

Ekscitacijski interneuroni u kralješničnoj moždini vjerojatno djeluju preko ekscitacijskih aminokiselina, SP, neurotenzina, VIP-a. Inhibicijski interneuroni imaju važnu ulogu u regulaciji nociceptivne transmisije. Oni mogu izravno djelovati na neurone u dorzalnom rogu kralješnične moždine (postsinaptički) i/ili na središnje aferentne završetke (presinaptički). Do danas su prepoznati neurokemijski različiti tipovi inhibitornih interneurona, poput kolinergičnih, opioidnih i onih koji djeluju preko γ-amino maslačne kiseline (GABA-e).

Ekscitacijski i inhibicijski interneuroni postoje i u talamusu, gdje sudjeluju u regulaciji transmisije nociceptivnih signala (41,46).

1.2.5. Modulacija nocicepcije

Prijenos bolnih informacija može se regulirati i modulirati na različite načine:

1. Istovremeni podražaj ne-nociceptivnih mehanoreceptora (Aα- i Aβ-vlakna) uzrokuje aktivaciju inhibicijskih interneurona u dorzalnom rogu kralješnične moždine, koji preko endorfina ili GABA-e smanjuju transmisiju bolnih informacija. To je tzv. teorija o kontroli boli vratima („gate theory“) (47).

2. Stimulacija sive tvari oko akvedukta u mezencefalonu aktivira *raphe magnus* jezgre u kojima su smješteni serotoninergični neuroni, čiji aksoni silaze u dorzalni rog duž spinalnog dorzolateralnog funikula (48). Silazni putovi mogu inhibirati ili pojačavati transmisiju u dorzalnom rogu kralješnične moždine. Inhibicijski silazni putovi imaju antinociceptivnu zadaću jer se smanjuje lučenje ekscitacijskih neurotransmitora iz središnjih završetaka aferentnih neurona. To se postiže izravnom inhibicijom središnjih ogranaka ili indirektno - preko inhibicije ekscitacijskih interneurona, odnosno ekscitacije inhibicijskih interneurona u dorzalnom rogu kralješnične moždine. Ekscitacijsko djelovanje silaznih putova na transmisiju u dorzalnom rogu ovisi o vrsti neurona na koji djeluju i podskupinama receptora preko kojih neurotransmitori djeluju. Čini se da u stanjima kronične nocicepcije dolazi do aktivacije silaznih inhibicijskih i ekscitacijskih putova (48).

1.2.6. Etiološka podioba boli

Osim prema porijeklu (kutana, mišićna, visceralna i dr.), bol je moguće razvrstati na različite načine: na temelju trajanja, etiologije ili patofiziologije, intenziteta, simptoma. Dok se prema trajanju grubo dijeli na akutnu i kroničnu, prema etiologiji je moguće, kao najvažnije oblike, razlikovati nociceptivnu, upalnu i neuropatsku bol. Ove se vrste međusobno razlikuju po mehanizmima nastanka, patofiziološkim karakteristikama i trajanju (49) (Tablica 3).

1. **Nociceptivna bol** nastaje uslijed djelovanja podražaja visokog intenziteta na periferne nociceptore u fiziološkim uvjetima (Tablica 3). Akutni bolni podražaj termalnog (>47 °C), mehaničkog (pritisak, ubod) ili kemijskog karaktera aktivira specifične receptore (na primjer, vaniloidne TRPV1 receptore) ili ionske kanale (na primjer, na kiselinu osjetljive ionske kanale - ASIC) na perifernim živčanim završecima C- i Aδ-vlakana (49). Podražaj TRPV1 receptora dovodi do lokalnog lučenja glutamata iz perifernih okončina. Glutamat djeluje preko AMPA, NMDA i kainatnih receptora doprinoseći nocicepciji. Nastali akcijski potencijal se prenosi u kralješničnu moždinu gdje se aktiviraju sljedeći neuroni u osjetnom putu. Izlučeni glutamat u središnjim sinapsama djeluje preko AMPA receptora koji su odgovorni za brzu sinaptičku transmisiju i preko NMDA receptora koji se aktiviraju uslijed učestalog ulaza impulsa s periferije. Ako je podražaj dovoljnog intenziteta, luči se i spori neurotransmitor SP. Ovaj neuropeptid preko neurokininskih NK1 receptora pojačava postsinaptičku ekscitaciju spinalnih neurona. Aksoni tih neurona uzlaze u više centre, tj. talamus na suprotnoj strani (spinotalamički trakt) i somatosenzorni korteks, odnosno preko parabrahijalne jezgre moždanog debla u područja koja su uključena u afektivnu komponentu boli, kao što su ventralna medijalna jezgra hipokampusa i središnja jezgra amigdale (50). Nociceptivna bol djeluje kao rani sustav upozorenja organizma na moguću ozljedu tkiva .

Tablica 3. *Vrste, trajanje, glavne osobine i izvori boli (prema ref. 41)*

Vrsta boli	Trajanje boli	Glavne osobine boli	Izvor boli	Primjer
Nociceptivna (odgovor na podražaj koji upozorava tijelo na moguću ozljedu tkiva)	Sekunde	Akutna - fazična; intenziteta i trajanja koji su „proporcionalni uzroku“	Privremena aktivacija nociceptora	Kontakt s vrućom pločom
Upalna (odgovor na ozljedu tkiva i prateći upalni proces)	Sati do dani	Primarna i sekundarna hiperalgezija, alodinija	Aktivacija nociceptora podražajem ili upalnim medijatorima na mjestu ozljede	Upalni artritis
Neuropatska (uzrokovana ozljedom ili disfunkcijom živčanog sustava)	Mjeseci do godine	Primarna i sekundarna hiperalgezija, alodinija Spontana bol Parestezije/distezije, Izražena afektivna komponenta	Različiti periferni i središnji mehanizmi	Neuralgije Periferne neuropatije Dijabetička neuropatija

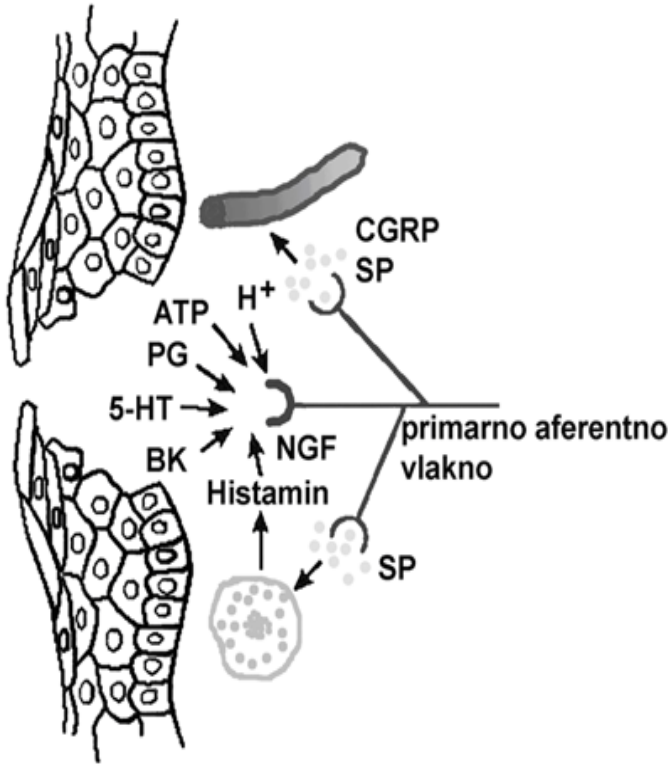
2. Upalna bol nastaje kao posljedica upale ili ozljede tkiva. Periferno se, iz stanica oko nociceptora (na primjer, trombocita, mastocita, leukocita, fibroblasta), luče tvari, poput različitih kinina, serotonina, eikosanoida, citokina i dr. (Slika 4). Aktivacijom nociceptora neke se tvari, poput SP i CGRP-a, luče iz kolateralnih živčanih završetaka istog nociceptora (aksonski refleks). Živčani impuls koji je nastao u jednom ogranku aksonom se prenosi u kralješničnu moždinu, ali se antidromno rasprostire i u ostale kolateralne aksonske ogranke. To uzrokuje lučenje neuropeptida u koži. SP dovodi do vazodilatacije, a CGRP povećava kapilarnu permeabilnost (43).

Dok neki medijatori upale, kao serotonin, ATP i protoni, djeluju izravno aktivirajući nociceptore, drugi neizravno interferiraju sa signalnim procesima unutar nociceptora (49). Kao posljedica, smanjuje se prag aktivacije nociceptora, a podražljivost membrane aferentnog završetka se povećava. To je stanje periferne senzitizacije (vidi kasnije: Senzitizacija i mehanizmi nastanka).

Pri upali dolazi do aktivacije i tzv. tihih („silent“) nociceptora (10-20% C-nociceptora u koži koji se ne aktiviraju bolnim podražajima u fiziološkim uvjetima). Oni se, djelovanjem medijatora upale, senzitiziraju i odgovaraju na podražaje niskog i visokog intenziteta termalne, mehaničke i kemijske prirode (41).

Tijekom učestalog izbijanja primarnih aferentnih neurona, pri upali dolazi i do brojnih promjena u SŽS-u, poput središnje senzitizacije, kao i do promjena fenotipa, tj. promjena u transkripciji gena za različite molekule uključene u proces nocicepcije (Tablica 4). Tako se neurotropini, poput faktora rasta živčanih stanica, oslobođeni iz makrofaga, fibroblasta,

Schwannovih stanica ili keratinocita na periferiji, retrogradno prenose u stanična tijela perifernih aferentnih C-vlakana u senzornim ganglijima dorzalnih korjenova (51). Tu modificiraju transkripciju gena i povećavaju stvaranje mnogih molekula, poput SP, CGRP, NO, ali i vaniloidnih receptora, skupine Na^+ kanala, receptora za SP, CGRP, bradikinin i sl. (41). Novostvorene molekule mogu anterogradno putovati na periferiju povećavajući količinu neurotransmitora, odnosno broj receptora u perifernom aferentnom završetku.



Slika 4. ***Periferni mehanizmi upalne boli*** *(modificirano prema ref. 35)*
Kada akcijski potencijal stigne do perifernih ogranaka senzornih živaca, promjene napona uzrokuju lučenje neuropeptida. Oni djeluju parakrino na susjedne stanice i dovode do povećanja protoka krvi, vazodilatacije, ekstravazacije proteina plazme, degranulacije upalnih stanica, povećanja adhezivnosti leukocita za vaskularni endotel.

Tijekom upalnih promjena može doći i do promjena fenotipa u Aβ-vlaknima. Ova vlakna sada poprimaju neke karakteristike C-vlakana, kao što je ekspresija SP, i počinju prenositi bolne impulse.

Smatra se da kao posljedica ovakvih promjena nastaju stanja povećane osjetljivosti na bolne podražaje (hiperalgezija), ali i na podražaje koji inače nisu bolni (alodinija), što će biti opisano kasnije u tekstu.

3. Neuropatska bol nastaje kao posljedica ozljede ili disfunkcije perifernog živčanog sustava i/ili SŽS-a npr. u dijabetesu, kroničnom alkoholizmu, HIV-infekciji, ozljedi kralješnične moždine i sl. (52,53).

Patofiziologija ove vrste boli je vrlo složena, a uključuje brojne patološke promjene na periferiji, tj. mjestu ozljede živca, kao i na spinalnoj te supraspinalnoj razini (54) (Tablica 4).

A. Periferija - Oštećenje vlakana malog ili velikog promjera dovodi do značajnih promjena u njihovoj podražljivosti i provođenju impulsa. To je vjerojatno posljedica promjena u gustoći i funkcionalnosti različitih ionskih kanala, poput N tipa Ca^{2+} kanala, Na^{+} i K^{+} kanala. Posljedično, membranska ekscitabilnost na mjestu ozljede se poveća dovoljno da dovede do spontanih - o podražaju neovisnih nastajanja akcijskih potencijala i tzv. spontane - o podražaju neovisne boli (55).

Na mjestu ozljede i degeneracije neurona dolazi do lučenja medijatora upale i upalnog odgovora koji uključuje acidozu i infiltraciju stanicama imunog sustava. Izlučeni medijatori (npr. serotonin, ATP, NO, prostaglandini, citokini) mogu djelovati izravno ili neizravno povećavajući bol. I neozlijeđena vlakna u blizini ozljede mogu sudjelovati u prijenosu bolnih impulsa (54). Na primjer, učestalo izbijanje Aβ-neurona zbog ozljede može dovesti do pojave depolarizacije u susjednim C-vlaknima. Drugi primjer interneuronalnih interakcija je prijelaz napona s mjesta demijelinizacije oštećenog neurona na susjedne intaktne neurone (41) (Tablica 4).

Dolazi i do simpatičke inervacije perifernih aferentnih vlakana i senzornih ganglija. Povećava se i broj funkcionalnih adrenergičnih receptora (55).

B. Kralješnična moždina - Kao posljedica hiperaktivnosti nociceptora nakon periferne ozljede živca, dolazi do značajnih promjena u kralješničnoj moždini, pri čemu se ekscitabilnost neurona u dorzalnom rogu kralješnične moždine značajno povećava, tj. dolazi do središnje senzitizacije. Povećava se ekspresija postsinaptičkih Na^{+} kanala, te presinaptičkih N-tipa Ca^{2+} kanala, što sve doprinosi procesu senzitizacije (53).

Neuropatsku bol karakteriziraju i središnje reorganizacijske (plastične) promjene u sinaptičkim kontaktima između neurona niskog praga podražaja (Aβ-vlakna) i nociceptivnih neurona, koji sada inerviraju i druge lamine dorzalnog roga kralješnične moždine, kao što je npr. inervacija lamine II Aβ-vlaknima.

Također, dolazi i do redukcije inhibicijskih mehanizama uslijed gubitka inhibicijskih interneurona, kao i do smanjenja sinteze inhibicijskih neurotransmitora GABA-e i glicina u dorzalnom rogu kralješnične moždine (središnja dezinhibicija) (41). Osim toga, novija saznanja upućuju na to da izlučena GABA ne djeluje inhibicijski, već da sada pojačava transmisiju u dorzalnom rogu kralješnične moždine zbog poremećaja homeostaze gradijenta aniona u neuronima (redukcija ekspresije molekule transportera K^{+}/Cl^{-}) (56).

Središnjoj povećanoj podražljivosti mogu doprinijeti i ekscitatorni proupalni citokini, kao i glutamat, izlučeni iz glija stanica u kralješničnoj moždini (57).

C. Mozak – Čini se da nakon periferne ozljede živca dolazi do senzitizacije neurona u talamusu i somatosenzornom korteksu, pri čemu vjerojatno glutamat ima ključnu ulogu (54).

1.2.7. Senzitizacija i mehanizmi nastanka

Fenomeni senzitizacije, tj. pojačanja osjeta uslijed ponovljenog i učestalog podraživanja nociceptora, svojstveni samo kompleksnom osjetu boli, ostaju djelomično nerazjašnjeni.

Dok kod drugih osjetnih stanica dugotrajniji podražaji uzrokuju njihovu prilagodbu i smanjenu podražljivost, kod senzornih neurona koji prenose bolne impulse to nije slučaj. Dugotrajnim podraživanjem nociceptora bol se pojačava i iz akutne prelazi u kroničnu.

Periferna i središnja senzitizacija karakteriziraju upalnu i neuropatsku vrstu boli (Tablica 4).

Periferna senzitizacija je stanje povećane podražljivosti nociceptora. Periferno oslobođeni medijatori upale, poput bradikinina i prostaglandina, vežu se za metabotropne receptore spregnute s G-proteinima na membranama perifernih aferentnih završetaka. Oni dovode do aktivacije protein kinaza A i C koje fosforiliraju ionske kanale i receptore (39,49). Kao rezultat toga, smanjuju se pragovi aktivacije receptora i ionskih kanala, npr. TRPV1 receptora na termalni podražaj, ASIC ionskih kanala na protone i dr. Podražljivost membrane nociceptora se povećava.

Središnja senzitizacija, tj. povećana podražljivost neurona drugog reda u dorzalnom rogu kralješnične moždine, uključuje različite i vrlo kompleksne promjene u kralješničnoj moždini, a nastaje kao posljedica periferne sensitizacije i učestalog ulaza informacija s periferije. Središnja sensitizacija može biti a) brza i b) odgođena (39).

a) *Brza senzitizacija* nastaje uslijed lučenja glutamata i neuropeptida iz središnjih aksona primarnog neurona. Uloga glutamata u procesu središnje senzitizacije je posebno važna i vrlo kompleksna (58). Dok akutna stimulacija nociceptora rezultira središnjim lučenjem glutamata koji djeluje preko AMPA receptora, tijekom pojačanog ulaza informacija s periferije dolazi do aktivacije NMDA receptora. Posljedično, povećava se koncentracija Ca^{2+} postsinaptički, što uzrokuje aktivaciju neuronalne NO sintetaze koja katalizira stvaranje NO iz L-arginina. NO difundira kroz membranu u presinaptičku stanicu, gdje se aktivira kaskada NO-ciklički gvanozin monofosfat, te se povećava lučenje ekscitacijskih aminokiselina i SP u središnje sinapse (58,59). Osim postsinaptički, SP može djelovati i preko autoreceptora na presinaptičkim središnjim okončinama aferentnih vlakana pojačavajući lučenje glutamata.

Ca^{2+}, SP i drugi kinini, koji djeluju preko metabotropnih receptora na središnjim neuronima, aktiviraju protein kinaze A i C. Posljedično, dolazi do fosforilacija receptora ili ionskih kanala i povećanja njihove podražljivosti (59). Povećava se i broj NMDA receptora.

Glija stanice dorzalnog roga kralješnične moždine također mogu biti važne u procesu središnje senzitizacije. Mogu se aktivirati glutamatom, SP, NO i prostaglandinima. Aktivirane glija stanice luče proupale citokine, poput faktora tumorskog rasta i interleukina, te ATP, NO i dr. Time se dodatno povećava lučenje ekscitacijskih aminokiselina i SP iz presinaptičkih okončina (60).

b) Odgođena središnja senzitizacija nastaje kao posljedica transkripcijskih promjena u neuronima dorzalnog roga kralješnične moždine. Zbog oslobađanja i aktivacije različitih transkripcijskih faktora, poput citokina iz glija stanica, dolazi do povećane ekspresije gena, poput onih. za *c-fos* i ciklooksigenazu$_2$ (COX_2). Posljedica je povećana sinteza prostaglandina koji djeluju postsinaptički i presinaptički povećavajući ekscitatornu ili reducirajući inhibitornu transmisiju (49). Povećava se i ekspresija gena za prodinorfin, neurokinin i za različite receptore. Čini se da posebnu ulogu u procesu središnje

senzitizacije i transkripcijskim promjenama može imati i kinaza aktivirana mitogenom (MAP kinaza) (59,61). Međutim, mehanizmi transkripcijske regulacije u senzornim ganglijima dorzalnih korjenova i u neuronima u dorzalnom rogu kralješnične moždine još uvijek su u velikoj mjeri nerazjašnjeni.

Tablica 4. *Osnovni periferni i središnji mehanizmi upalne i neuropatske boli (prema ref. 41)*

Upalna bol	**Neuropatska bol**
Periferni mehanizmi	
- izravna aktivacija nociceptora upalnim medijatorima - periferno lučenje neuropeptida iz eferentnih završetaka - recipročne interakcije između nociceptora i okolnih stanica, npr. imunog sustava u modulaciji transmisije - senzitizacija nociceptora preko aktivacije protein kinaza - promjena ekspresije gena u tijelima perifernih C-vlakana	- aktivacija oštećenih i neoštećenih perifernih aferentnih živčanih vlakana medijatorima upale - senzitizacija nociceptora i pojava spontane ekscitabilnosti na mjestu ozljede vlakana - ne-sinaptičke interakcije neurona u ganglijima dorzalnih korjenova - povećana simpatička inervacija senzornih ganglija i povećanje lučenja drugih medijatora - promjena ekspresije gena u tijelima oštećenih C-vlakana ili Aβ-vlakana - promjena u funkcionalnim svojstvima i mogućnostima regeneracije oštećenih perifernih završetaka
Središnji mehanizmi	
- senzitizacija neurona dorzalnog roga kralješnične moždine - funkcionalna redukcija silaznih inhibicijskih mehanizama, pojačanje funkcije silaznih ekscitacijskih putova -adaptivne promjene u talamusu, korteksu i drugim centrima	- senzitizacija neurona dorzalnog roga kralješničke moždine - reorijentacija Aβ-vlakana iz lamina III/IV u druge lamine dorzalnog roga kralješnične moždine (II); C-vlakna i silazni neuroni također mogu inervirati druge lamine - funkcionalna redukcija aktivnosti inhibitornih interneurona, pojačanje funkcije silaznih ekscitacijskih putova - adaptivne promjene u talamusu, korteksu i drugim centrima

Sve navedene promjene, do kojih dolazi na periferiji i/ili središnje, doprinose povećanoj podražljivosti neurona u osjetnom putu, kao i pojačanju odgovora na bolne podražaje.

1.2.8. Hiperalgezija i alodinija

Hiperalgezija i alodinija karakteriziraju različita klinička bolna stanja, npr. neuropatsku bol (53), a javljaju se kao dominantni simptomi u različitim eksperimentalnim modelima boli.

Hiperalgezija označava povećanu osjetljivost na bolne podražaje. Može biti a) primarna - na mjestu ozljede tkiva/živca i b) sekundarna - nastaje izvan mjesta ozljede.

Alodinija označava povećanu osjetljivost na podražaje koji nisu bolni, poput dodira (41) (Tablica 5).

Tablica 5. *Mjesto nastanka, tip podražaja, uzrok i pretpostavljeni mehanizmi nastanka hiperalgezije (primarne i sekundarne) i alodinije*

Stanje	Tip podražaja	Uzrok	Mehanizam
HIPERALGEZIJA			
Primarna - na mjestu ozljede tkiva	Termalni, mehanički, kemijski	Ozljeda tkiva, upalni medijatori i/ili dugotrajan bolni podražaj	Promjena fizioloških i farmakoloških osobina perifernih C i Aδ-vlakana
Sekundarna - izvan mjesta ozljede tkiva	Mehanički	Ozljeda tkiva, ozljeda živaca	Povećana podražljivost središnjih neurona, djelomično neovisne o ulazu preko C i Aδ-vlakana s periferije
ALODINIJA	Mehanički, npr. dodir	Ozljeda živčanog sustava	Aktivacija Aβ-vlakana, središnja senzitizacija, reorganizacija neurona dorzalnog roga kralješnične moždine
	Hladnoća	Ozljeda živčanog sustava	Aktivacija senzitiziranih neurona u dorzalnom rogu kralješnične moždine s C-vlaknima osjetljivim na kapsaicin

Mehanizmi nastanka primarne hiperalgezije su donekle jasni: njenom nastanku najviše doprinose događaji na razini nociceptora, poput periferne senzitizacije (62). Mehanizmi nastanka sekundarne hiperalgezije i alodinije su dosta kompleksni i još uvijek nerazjašnjeni. Čini se da su zbivanja na periferiji (uslijed ozljede tkiva ili živaca) odgovorna za njihov nastanak, a da jednom nastala preosjetljivost više nije ovisna o dolaznim informacijama s periferije (41). Na to upućuju različiti eksperimentalni dokazi. Jedan od dokaza je održanost sekundarne mehaničke hiperalgezije i nakon blokiranja perifernog ulaza lokalnim anestetikom lidokainom ili nakon presijecanja dorzalnih

senzornih korjenova (63). Čini se da su središnja senzitizacija i povećana podražljivost neurona dorzalnog roga kralješnične moždine, zatim reorganizacija neurona i aktivacija Aβ-vlakana, odgovorne za održavanje nastale mehaničke preosjetljivosti.

1.2.9. Liječenje boli

Dvije su osnovne skupine lijekova s analgetskim djelovanjem koji se razlikuju po mjestu i mehanizmu djelovanja u procesu nocicepcije, po jačini djelovanja i nuspojavama (Slika 5).

To su:

1. nesteroidni anti-inflamatorni lijekovi (NSAIL) koji smanjuju sintezu prostaglandina blokirajući enzim ciklooksigenazu na periferiji i u kralješničnoj moždini, a djelotvorni su u boli blagog do srednje jakog intenziteta;

2. opioidni agonisti koji, djelujući u mozgu, pojačavaju silaznu inhibiciju, dok u kralješničnoj moždini smanjuju lučenje ekscitacijskih neurotransmitora i podražljivost neurona dorzalnog roga kralješnične moždine. Djelotvorni su u boli jakog intenziteta.

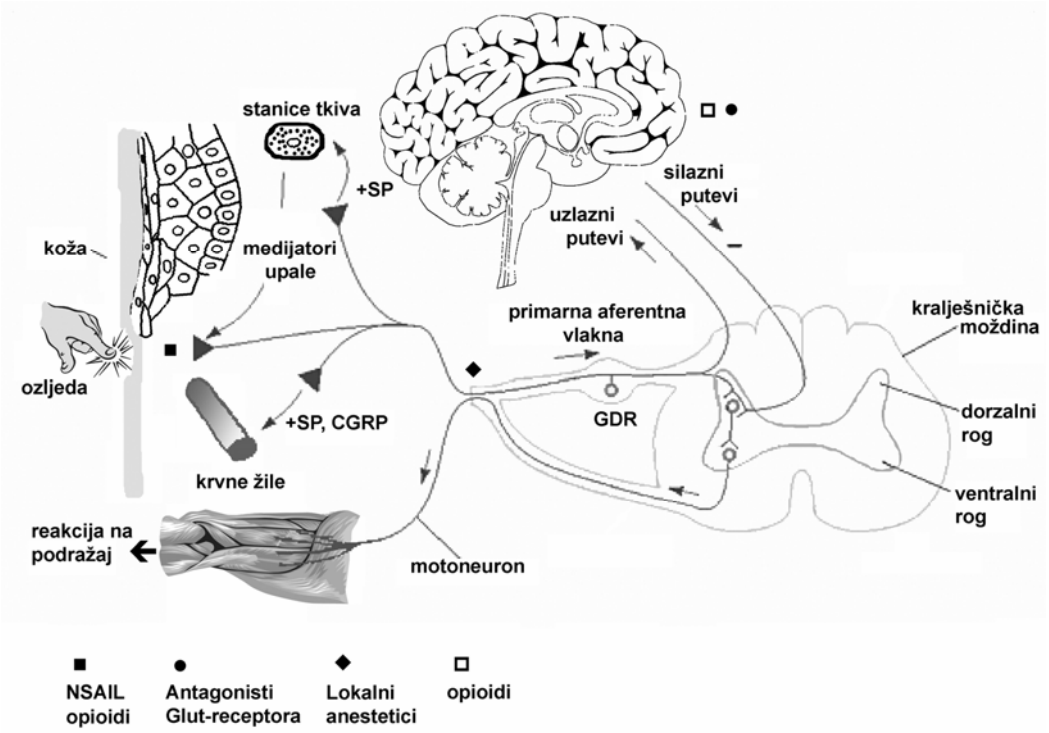
Međutim, u liječenju različitih bolnih stanja kroničnog trajanja, a pogotovo u slučaju neuropatske boli s vrlo kompleksnom patofiziologijom, klasični analgetici nisu djelotvorni, pa se koriste

3. lijekovi koji primarno nisu analgetici, poput lokalnih anestetika, antiepileptika, antiaritmika. Ovi lijekovi svojim mehanizmima djelovanja, kao što je blokiranje N-tipa Ca^{2+} kanala (gabapentin) i Na^{+} kanala (lidokain), utječu na nastanak i/ili provođenje bolnih impulsa na periferiji i/ili u SŽS-u i tako stabiliziraju ili moduliraju funkciju nociceptora i drugih neurona u osjetnom putu (64).

Dodatne terapijske mogućnosti uključuju:

4. primjenu kombinacije više tvari s različitim mehanizmima i mjestima djelovanja kako bi se postigao bolji i sigurniji analgetski učinak, a uz manje nuspojava (npr. kombinacija neopioidnih i opioidnih analgetika) i

5. novije lijekove, od kojih su neki u fazama ispitivanja, poput agonista TRPV1 receptora, antagonista purinergičnih, serotoninergičnih $5\text{-}HT_3$ i glutamatnih NMDA receptora, ali i tvari poput kanabinoida.



Slika 5. ***Mjesta djelovanja različitih skupina lijekova u osjetnom putu*** *(prilagođeno prema ref. 64). Na svakom mjestu u osjetnom putu moguće je interferirati s prijenosom bolnih impulsa. Dok neki lijekovi djeluju periferno utječući na senzitizaciju nociceptora (NSAIL), drugi djeluju na provođenje impulsa duž primarnog aferentnog vlakna (anestetici), a treći djeluju u središnjim sinapsama (kanabinoidi, opioidi i dr.) djelujući dodatno i na afektivnu komponentu boli. (**GDK** - ganglij dorzalnog korijena; **Glut**- glutamatni)*

Ovi lijekovi djeluju kratkotrajno, zbog čega liječenje kronične boli zahtijeva njihovu dugotrajnu i učestalu primjenu.

Za sada, nema lijeka koji bi dugotrajno smanjio ili uklonio bol nakon jednokratne primjene.

1.3. Botulinum toksin tipa A i bol

1.3.1. Klinička ispitivanja antinociceptivnog djelovanja botulinum toksina tipa A

Povoljno djelovanje BT-A na bol prve su pokazale studije u bolesnika s cervikalnom distonijom. Olakšanje boli nastupilo je prije, trajalo je dulje i bilo je ječe izraženo od miorelaksirajućeg učinka BT-A (65).

Različiti klinički nalazi do danas, koji uglavnom proizlaze iz pojedinačnih opažanja na malom broju pacijenata, ukazuju na moguće analgetsko djelovanje BT-A i u stanjima koja nisu praćena povećanom mišićnom kontrakcijom. Tako postoje nalazi o povoljnom djelovanju BT-A u neuropatske boli (66), kronične dnevne glavobolje (67), kronične tenzione glavobolje (68), migrene (69) (Tablica 6).

Međutim, rezultati takvih kliničkih opažanja su dosta često i kontradiktorni. Razlog tome može biti nedostatak smjernica za primjenu BT-A u bolnim stanjima, pa je doziranje i injiciranje toksina, kao i vrednovanje boli u pacijenata vrlo različito.

Klinička opažanja ukazuju na dugotrajano (višemjesečno) smanjenje boli nakon jednokratne lokalne primjene malih doza BT-A. Analgetik takvih osobina bi za farmakoterapiju boli mogao biti od posebne važnosti. Međutim, realna je potreba za pravim kontroliranim dvostruko–slijepim pokusima na većem broju pacijenata, kako bi se dobili odgovori na ključna pitanja o:

1. indikacijama za primjenu BT-A;

2. mjestima i načinu injiciranja BT-A;

3. djelotvornim dozama BT-A (raspon doza, da li se povećanjem doza pojačava i produljuje djelovanje);

4. trajanju djelovanja BT-A u pojedinim indikacijama.

Tablica 6. *Rezultati kliničkih studija primjene BT-A u liječenju različitih bolnih stanja (kraniocervikalna distonija, piriformis sindrom, miofascijalni bolni sindrom, bol donjeg dijela leđa, kronična orofacijalna bol, postoperacijska bol, kronična tenziona glavobolja, migrena, neuropatska bol, intersticijski cistitis)*

Indikacija	Doza BT-A /način primjene	Rezultat terapije		Ref.
Kraniocervikalna distonija	100 i.j./ i.m.	+	Poboljšanje stanja uz značajno olakšanje boli vrata počinje 1 tjedan nakon injiciranja i traje 11 tjedana	70
Piriformis sindrom	100 i.j. / i.m.	+	Značajno smanjenje boli kod pacijenata	71
Miofascijalni bolni sindrom	80-150 i.j./ i.m.	+	Značajna redukcija boli i 60 dana nakon injiciranja	72, 73
			vs.	*vs.*
	50-250 i.j./ i.m. na 5 mjesta	-	BT-A nije značajnije utjecao na bolnost kod bolesnika	74
Bol donjeg dijela leđa	5 x 40 i.j./ i.m. paravertebralno	+	Olakšanje boli i povratak funkcije u trajanju od 8 tjedana	75
Kronična orofacijalna bol	2 x 25 i.j. + 2 x 50 i.j./ i.m.	-	BT-A nije značajno utjecao na bol; dosta je pacijenata ispalo iz studija zbog bolnosti injekcija i nuspojava	76
Postoperacijska bol	8 i.j./kg/i.m. 5-10 dana prije operacija	+	Značajno smanjenje postoperacijske boli za čak 74% i smanjenje potrebe za analgeticima za 50%	77
Kronična tenziona glavobolja	45-90 i.j. u perikranijalne mišiće	+	Značajno smanjenje boli ili izostanak glavobolje, te smanjenje frekvencije glavobolja u trajanju od 18 mjeseci	78
			vs.	*vs.*
	1 i.j./kg / i.m.	-	BT-A nije pokazao analgetski učinak	79
	do 500 i.j. BT-A* u perikranijalne mišiće	-	BT-A nije utjecao na intenzitet i frekvenciju glavobolja	80

nastavak tablice na sljedećoj stranici

Migrena		25 -75 i.j./ i.m. u više «trigger» mjesta	+	preventivno se smanjuje intenzitet i frekvencija napada migrene u trajanju oko 3 mjeseca	81
				vs.	*vs.*
		16 i.j. u. frontalne ili 100 i.j. u frontalne i vratne mišiće	-	BT-A nije utjecao na frekvenciju i intenzitet migrene niti je utjecao na broj dana bez napadaja	82, 83
Neuropatska bol	Trigeminalna neuralgija	16 i.j./ i.m.	+	Značajno smanjenje boli u trajanju od 90 dana	84
	Postherpetička neuralgija	20 i.j/intradermalno	+	7 dana nakon injiciranja primjećeno je olakšanje boli koje je trajalo 4 mjeseca	85
	Periferna neuropatija	20 i.j/intradermalno	+	Unutar 3 dana smanjenje boli u trajanju od 6 tjedana	85
Intersticijski cistitis		100-200 i.j. na 20-30 mjesta submukozno u mjehur	+	Smanjenje boli za 79%, nokturije za 45% u trajanju od nekoliko mjeseci	86

„“ BT-A – komercijalni pripravak Dysport® (Ellan, Velika Britanija); u ostalim studijama BT-A – Botox® (Allergan, SAD); „+“ pozitivan rezultat (poboljšanje stanja); „-“ negativan rezultat*

1.3.2. Pretklinička ispitivanja antinociceptivnog djelovanja botulinum toksina tipa A

Pretklinička ispitivanja djelovanja BT-A na bol do danas su ograničena na nekoliko eksperimenata.

Prvi dokaz o antinociceptivnom djelovanju BT-A dobiven je na formalinskom modelu upalne boli u štakora, a izveden je u laboratorijima proizvođača Botoxa® (Allergan, SAD) (87,88). U posljednje vrijeme, objavljeno je nekoliko ispitivanja utjecaja BT-A na eksperimentalnu upalnu bol mjehura (89-94).

Formalinski model upalne boli karakteriziran je dvjema fazama. Nakon injiciranja otopine formalina u plantarnu površinu stražnje šape životinja, dolazi do pojave spontanih bolnih odgovora, poput trzanja i lizanja šape. Prva faza nastupa odmah nakon injiciranja upalne tvari, a traje 15 minuta. Ona je posljedica izravne stimulacije nociceptora formalinom. Druga faza je posljedica djelovanja oslobođenih upalnih medijatora i senzitizacije (87).

Periferno primijenjen BT-A u plantarnu površinu šape štakora inhibirao je neke od neurofizioloških i neurokemijskih učinaka formalina, kao što su periferno lučenje glutamata, ekspresija *c-fos* proteina u kralješničnoj moždini i aktivacija neurona u dorzalnim rogovima kralješnične moždine štakora (Tablica 7).

U ovim ispitivanjima BT-A nije utjecao na prvu fazu formalinskog testa, niti je mijenjao prag osjetljivosti na termalni podražaj.

Tablica 7. *Učinci BT-A na promjene ponašanja, lokalnu upalu, lokalno lučenje glutamata, aktivnost neurona stražnjeg roga kralješnične moždine i broj fos-sličnih proteina u kralješničnoj moždini u formalinskom modelu upalne boli u štakora (87,88)*

Vrsta mjerenja	Skupina		
	FORMALIN	**BT-A+FORMALIN**	**Ref.**
1. promjena ponašanja - vrijeme lizanja šape	- injiciranje formalina uzrokuje dvo-fazični odgovor; kao pokazatelj boli mjerilo se vrijeme koje štakor liže injiciranu šapu	- pred-tretman s BT-A je smanjio bolne odgovore samo u drugoj fazi formalinskog testa ovisno o dozi (3,5-30 i.j./kg, s.c.)	87
2. lokalna upala – debljina šape	- injiciranje formalina uzrokuje edem pri čemu se debljina šape poveća za oko 35%	- pred-tretman s BT-A, u dozi od 7 i.j./kg, smanjio je edem šape za oko 50%, a nije djelovao u dozi 3,5 i.j./kg	87
3. lokalno lučenje glutamata nakon injiciranja formalina	- u dijalizatu tkiva šape nakon formalina izmjereno je 220%-tno povećanje koncentracije glutamata	- pred-tretman s BT-A, neovisno o dozi (3,5; 7 i 15 i.j./kg), smanjio je formalinom-uzrokovano lučenje glutamata za oko 35-45%	87
4. elektrofiziološka mjerenja aktivnosti neurona stražnjeg roga kralješnične moždine	- formalin uzrokuje dvo-fazično povećanje aktivnosti neurona	- BT-A je „ovisno o dozi" (7, 15 i 30 i.j./kg) smanjio formalinom-uzrokovanu ekscitaciju neurona samo u drugoj fazi testa	88
5. imunohistokemijsko određivanje *fos*-sličnih proteina u kralješničnoj moždini	- povećan ukupan broj *fos* pozitivnih neurona 2 sata nakon formalina u laminama I/II i V/VI	- pred-tretman s BT-A (15 i 30 i.j./kg) je „ovisno o dozi", smanjio ukupan broj *fos* pozitivnih stanica	88

Pretpostavljeno je, na osnovu prikazanih rezultata formalinskog testa, da antinociceptivno djelovanje BT-A kod upalne boli uključuje perifernu inhibiciju lučenja glutamata, čime je smanjena periferna, a indirektno i središnja senzitizacija.

Eksperimentalni modeli kroničnog cistitisa karakterizirani su akutnom ili kroničnom hiperaktivnošću mjehura (smanjenje intervala između kontrakcija). Tijekom upalnog procesa uzrokovanog kemijskim tvarima, poput octene kiseline, ciklofosfamida ili zbog ozljede kralješnične moždine, u stjenci mokraćnog mjehura dolazi do aktivacije živčanih vlakana, te epitelnih i paraepitelnih stanica, što vjerojatno doprinosi nastanku i intenzitetu boli. Interval između kontrakcija mjehura bio je pokazatelj intenziteta boli, odnosno

antinociceptivnog djelovanja BT-A. Što je interkontrakcijski interval manji, to je intenzitet boli veći (Tablica 8).

Tablica 8. *Rezultati ispitivanja djelovanja BT-A na eksperimentalnu upalu bol mjehura uzrokovanu octenom kiselinom, ciklofosfamidom, ATP-om i kapsaicinom, te na bol uzrokovanu transekcijom kralješnične moždine*

Pokus	Način primjene BT-A	Rezultat	Ref
Utjecaj BT-A na upalnu bol mjehura uzrokovanu octenom kiselinom (0,3%)	25 i.j./1 mL u mjehur 3 i 7 dana prije uzrokovanja upale	- BT-A je povećao interkontrakcijski interval za 60% i imunoreaktivnost CGRP-a u aferentnim završecima 7, ali ne 3 dana nakon primjene	89
Utjecaj BT-A na kroničnu upalu i bol mjehura uzrokovanu ciklofosfamidom (3 x kroz 10 dana, i.p.)	20 i.j./1 mL u mjehur 10 dana prije uzrokovanja upale	- BT-A je smanjio *fos*- pozitivne stanice za oko 50% u kralješničnoj moždini; reducirao je frekvencije kontrakcija mjehura u bazalnim i upalnim uvjetima	90
	20 i.j./1 ml u mjehur štakora	- BT-A je smanjio stimulacijom - uzrokovano lučenje ATP-a iz živčanih završetaka epitelnih stanica mjehura za 69%, te frekvencije kontrakcija mjehura i aktivnost C-aferentnih vlakana	91
Upala i bol mjehura uzrokovana infuzijom ATP-a i kapsaicina u mjehur	0,5 i 1 i.j. injicirano u mjehur	- BT-A je smanjio frekvenciju i amplitudu kontrakcija mjehura nakon ATP-a, dok nije značajnije utjecao na učinke kapsaicina (?)	92
Hiperaktivnost mjehura kao pokazatelj boli nakon transekcije kralješnične moždine	20 i.j./1mL u mjehur 5 dana prije mjerenja	- BT-A je smanjio (za 53%) stimulirano lučenje ATP-a iz epitelnih stanica mjehura, a time i aferentnu aktivaciju u patološkim uvjetima, kao što je ozljeda kralješnične moždine	93
	20 i.j./1mL u mjehur 5 dana prije mjerenja	- smanjenje refleksnih kontrakcija mjehura za 71% 48 sati nakon BT-A, a bez utjecaja na amplitude kontrakcija	94

Pretpostavljeno je da povoljno djelovanje BT-A u ovim stanjima eksperimentalne upalne boli mjehura može biti posljedica smanjenja senzitizacije perifernih aferentnih vlakana, vjerojatno uslijed inhibicije lokalnog lučenja acetilkolina, ATP-a i SP, te redukcije ekspresije receptora za kapsaicin i ATP (95).

1.3.3. Mehanizam antinociceptivnog djelovanja botulinum toksina tipa A

Najjednostavnije objašnjenje mehanizma djelovanja BT-A u stanjima karakteriziranim povećanom mišićnom kontrakcijom ili stanjima povećane aktivnosti autonomnog živčanog sustava je lokalna inhibicija lučenja acetilkolina na motornoj ploči, odnosno okončinama parasimpatičkih živaca, a do koje dolazi zbog cijepanja SNAP-25 - jednog od tri ključna proteina u procesu neuroegzocitoze.

Za razliku od živčano-mišićne spojnice, gdje su mehanizmi i karakteristike djelovanja BT-A dosta istraživani u *in vitro* i *in vivo* pokusima, mehanizmi i karakteristike mogućeg djelovanja na senzorne neurone su u velikoj mjeri neistraženi. Tako je djelomično nejasno na koji način toksin ulazi u stanice i da li je to ovisno o aktivnosti neurona. Na osnovu *in vitro* pokusa, čini se da različiti podtipovi neurotoksina imaju drugačija vezna mjesta na membranama neurona, te da njihov ulazak u stanice može biti ovisan o tipu neurona (motoneuron *vs*. senzorni neuroni) (96).

Pokusi na kulturama stanica pokazali su da BT-A može inhibirati lučenje ne samo acetilkolina, već i drugih neurotransmitora, pa tako i onih koji su uključeni u proces nocicepcije (Tablica 9). Sredinom osamdesetih godina prošlog stoljeća jedno je istraživanje ukazalo na moguće postojanje akceptora za botulinum toksine u perifernom živčanom sustavu, ali i u SŽS-u (97). Time je sugerirana mogućnost ulaska BT-A u druge vrste stanica, izuzev motoneurona, kao i mogućnost inhibicije neuroegzocitoze.

Tablica 9. *Učinci BT-A na lučenje neurotransmitora iz SŽS-a (tkiva mozga i kralješnične moždine)*

Tkivo	Inhibitorno djelovanje BT-A na lučenje:	Ref
Mozak	- acetilkolina kod velike koncentracije K^+ *in vitro*; smanjena je i produkcija acetilkolina uslijed smanjenog unosa kolina u stanice *in vitro*	98
	- acetilkolina, dopamina, noradrenalina, GABA-e iz ovisno o temperaturi, vremenu i Ca^{2+} *in vitro*	99
	- glutamata, ovisno o kalcijevim ionima *in vitro*	100
	- serotonina u bazalnim uvjetima i uslijed povišene koncentracije kalijevih iona *in vitro*	101
	- dopamina, spontano i uzrokovano, iz somatodendritičnih i terminalnih živčanih završetaka nakon *in vivo* injiciranja BT-A (1000 i.j.) u supstanciju nigru i striatum štakora	102
	- CGRP iz stanica trigeminalnog ganglija štakora *in vitro*	103
Kralješnična moždina	- ne-kolinergičnih neurotransmitora uključenih u inhibicijsku i ekscitacijsku transmisiju u pikomolarnim koncentracijama, dok u manjim dozama pokazuje selektivni učinak za motorne neurone *in vitro*	104
	- glicina i glutamata *in vitro*	105
	- SP ovisno o kalciju i u povišenoj koncentraciji K^+ *in vitro*	106
	- SP i glutamata, pri visokoj koncentraciji K^+ *in vitro*	107

Budući da su u *in vivo* pokusima Cui i sur. na modelu upalne boli u štakora izmjerili smanjenje lučenja glutamata iz perifernih okončina aferentnih živaca (87), pretpostavljeno je da BT-A i u *in vivo* uvjetima ulazi u senzorne neurone gdje cijepa SNAP-25 protein. Posljedično, BT-A bi inhibirao lučenje ne samo glutamata, već i različitih neuropeptida iz perifernih aferentnih završetaka. Time bi se smanjila periferna senzitizacija kod upalne boli. Na sličan način pokušalo se objasniti i djelovanje toksina na visceralnu bol mjehura.

Međutim, nedavnim je pokusom pokazano da većina nemijeliniziranih perifernih i središnjih završetaka senzornih živaca koji luče glutamat imaju smanjenu ekspresiju SNAP-25 proteina (108). Postoje i nalazi da se egzocitoza neuropeptida iz senzornih neurona odvija neovisno od SNARE proteina (109,110). Ovi pokusi dovode u pitanje ulogu SNAP-25 proteina u procesu neuroegzocitoze iz senzornih nociceptivnih neurona.

Nekoliko pretkliničkih *in vivo* nalaza s kraja 70-tih godina prošlog stoljeća, unatoč eksperimentalnim ograničenjima (nemogućnost utvrđivanja porijekla detektirane radioaktivnosti), ukazalo je na mogućnost dolaska toksina u središnje strukture nakon njegove periferne primjene. Nakon i.m. injiciranja radioaktivno jodiranog BT-A, radioaktivnost je detektirana najprije u *n. ishiadicusu*, a zatim i u kralješničnoj moždini (111,112).

Suprotno spomenutim eksperimentima, koji su velikim dijelom pali u zaborav, nedavnim je istraživanjem difuzije radiojodiranog BT-A s mjesta primjene pokazano da većina radioaktivnosti ipak ostaje lokalizirana na mjestu injiciranja toksina (113).

2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA

Temeljem kliničkih opažanja i malog broja pretkliničkih ispitivanja, pretpostavlja se da BT-A ima antinociceptivno djelovanje koje nije isključivo povezano s uklanjanjem (bolne) spastičnosti mišića i učinkom na kolinergični sustav. Kao mehanizam antinociceptivnog djelovanja BT-A, prema analogiji s djelovanjem na neuromuskularnu vezu, predložena je inhibicija lučenja neurotransmitora uključenih u proces nocicepcije iz perifernih okončina senzornih neurona (aksonski refleks). To sprječavanje lučenja neurotransmitora BT-A bi polučivao cijepanjem SNAP-25 proteina, ključnog za proces egzocitoze.

Smatramo da predložena hipoteza nije dovoljno uvjerljiva jer postoje nalazi da SNAP-25 nije prisutan u senzornim neuronima. Tom hipotezom nije moguće objasniti niti dugotrajni učinak BT-A, opažen u različitim kliničkim bolnim stanjima.

Hipoteza ove disertacije polazi od toga da BT-A ima antinociceptivno djelovanje koje ne uključuje samo periferne, već i „gornje" dijelove nociceptivnog neurona, gdje toksin dolazi retrogradnim transportom nakon periferne primjene. BT-A bi tu mogao interferirati s procesima središnje senzitizacije.

Osim provjere hipoteze, dodatni ciljevi disertacije, budući da to do sada nije istraženo, su:

1. ispitati djelovanje BT-A na patofiziološki različite vrste boli (nociceptivna, upalna, neuropatska) koristeći odgovarajuće eksperimentalne modele i
2. provjeriti protuupalno djelovanje BT-A na eksperimentalnim modelima upale.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Životinje

Za istraživanja antinociceptivnog djelovanja BT-A korišteni su mužjaci štakora soja Wistar, stari 2-3 mjeseca, uzgajani na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Slijedio se Zakon o dobrobiti životinja (Narodne novine 19/1999), te smjernice Internacionalne asocijacije za ispitivanje boli (International Association for Study of Pain, IASP). Za obavljanje pokusa na projektima, čijih je ova disertacija dio, dobivena je dozvola Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (br. 07-76/2005-439).U eksperimentima koji zahtijevaju određeni kirurški zahvat životinje su bile anestezirane kloralhidratom u dozi 300 mg/kg (i.p.). Žrtvovanje životinja za potrebe uzimanja uzoraka tkiva obavljalo se cervikalnom dislokacijom.

3.2. Ispitivana supstancija – botulinum toksin tipa A

U pokusima je korišten BT-A (Botox®, Allergan, SAD; bočica sadrži 100 internacionalnih jedinica (i.j.) pročišćenog *Clostridium botulinum* toksina tipa A u obliku liofilizata). Jedna jedinica odgovara količini toksina koja nakon i.p. primjene uzrokuje smrt 50% miševa (LD_{50} = 0,048 ng = 1 i.j.). Sadržaj toksina u bočici otopljen je u fiziološkoj otopini, kako bi se dobile potrebne doze.
Korištene doze BT-A bile su, ovisno o pokusu, između 2 i 10 i.j./kg kod periferne primjene, između 0,25 i 2 i.j./kg kod središnje primjene, a za injiciranje u živac korištena je doza od 0,5 i.j./kg.

3.2.1. Primjena botulinum toksina tipa A

U pokusima ove disertacije BT-A je primijenjen na tri načina: periferno (s.c. u plantarnu stranu stražnje šape štakora), središnje (intratekalno) i intraneuronalno (u *n. ishiadicus).*

3.2.1.1. Periferna primjena

Nakon što je namještena u odgovarajući položaj, u plantarnu površinu stražnje desne šape štakora s.c. je injicirano (*Tuberculin syringe 27$_G$*, Becton Dickinson, SAD) 20 μL otopine BT-A u odgovarajućim dozama. Ispravnost injiciranja provjerena je opipavanjem injiciranog mjesta (mjehurić na mjestu injiciranja).

3.2.1.2. Intratekalna primjena

Životinje su anestezirane kloralhidratom, a s leđne strane im je zarezana koža i potkožje dužinom od oko 2 cm iznad lumbalnog segmenta kralješnice. Između četvrtog i petog lumbalnog kralješka injicirano je (*Tuberculin syringe 27$_G$*, Becton Dickinson, SAD) 20 μL otopine BT-A. Ispravnost injiciranja potvrđena je pomakom repa životinje. Životinjama su rezovi sašiveni, nakon čega su vraćene u kaveze. Prva mjerenja učinjena su barem 24 sata nakon injiciranja BT-A.

3.2.1.3. Intraneuronalna primjena

Životinje su anestezirane kloralhidratom, te im je s desne strane, uz bedrenu kost, napravljen rez dužine 2 cm kako bi se izolirao *n. ishiadicus*. Ispod izoliranog živca stavljen je komadić parafilma kako bi se spriječio gubitak BT-A uslijed mogućeg nepravilnog injiciranja. U *n. ishiadicus* je zatim pažljivo injicirano (*Hamilton syringe,* Hamilton,

Švicarska) 2 μL otopine BT-A. Parafilm je uklonjen jednu minutu nakon injiciranja, provjereno je da li je suh (ispravno injiciranje), te je rez sašiven. Prva mjerenja učinjena su nakon 8 sati.

3.3. Korištene kemikalije, reagensi i antitijela

Za pripremu otopina korištenih u ispitivanjima antinociceptivnog i protuupalnog djelovanja na eksperimentalnim modelima, upotrebljene su sljedeće **krute supstancije**: kloralhidrat (*Chloral hydrate*, Merck KGaA, Njemačka), karagenan *(λ-carrageenan*, Sigma, SAD), kapsaicin (*Capsaicin*, 8-Methyl-N-vanilyl-trans-6-nonenamide, Sigma, SAD), aloksan (*Alloxan monohydrate*, Sigma, SAD), streptozotocin (*Streptozocin*, Sigma, SAD), Evansovo modrilo (*Evan's blue*, Merck KGaA, Njemačka), kolhicin (*Colchicine*, Sigma, SAD). Sve su supstancije, osim kapsaicina, otopljene u odgovarajućem volumenu fiziološke otopine, kako bi se dobile potrebne doze. Kapsaicin je otopljen u fiziološkoj otopini kojoj je dodano 10% etanola (96%) i 10% Tween 80. Od **tekućih supstancija** korišteni su: formaldehid, 35% (Kemika, Hrvatska), etanol 96% (Kemika, Hrvatska), formamid (Kemika, Hrvatska), Tween 80 (Sigma, SAD).

Za izradu **gela i pufera u postupcima elektroforeze i Western blota,** te za izradu **pufera u postupku imunohistokemije,** korištene su sljedeće kemikalije: akrilamid (*Acrylamide*, Sigma, SAD), bisakrilamid (*Bis-N,N-methylen-bis-acrylamide*, Sigma, SAD), amonij persulfat (*Ammonium persulfate*, Sigma, SAD), TEMED (*TEMED*, Sigma, SAD), HEPES (*HEPES*, Sigma, SAD), NaCl (Kemika, Hrvatska), EDTA (Kemika, Hrvatska), NaF (Sigma, SAD), $ZnCl_2$ (Sigma, SAD), Tris (TRIZMA® base, Sigma, SAD) PMSF (*Phenylmethanesulfonyl fluoride*, Sigma, SAD), 2-merkaptoetanol (*2-Mercaptoäthanol*, MERCK-Schurchardt, Njemačka), bromfenol modrilo (*Bromphenol blue*, Sigma, SAD), glicerol (*Glycerol anhydrous*, Fluka, Švicarska) metanol (Kemika, Hrvatska), apsolutni etanol (Kemika, Hrvatska), boja Ponceau (*Ponceau solution*, Sigma-SAD); deterdženti: SDS (*Sodium dodecil sulphate*, Sigma, SAD), Tween 20 (Sigma, SAD) i Triton X-100 (Sigma, SAD); standard za određivanje molekulskih masa (*Full Range Rainbow™ Molecular Weight Markers,* Amersham Biosci, Velika Britanija). Korišteni su univerzalni razvijač (FR-16) i brzi fiksir (FF-2) (Fotokemika, Hrvatska).

Za elektroforezu korištene su kadice Bio-Rad i aparat (*PowerPack JR II Power supply,* Bio-Rad, SAD), nitrocelulozne membrane veličine pora 0,2 μm (*Nitrocellulose membrane*, Sigma, SAD), film za razvijanje (Ortho CP-G PLUS (medical X-ray film), AGFA, Belgija).

Korišteni su sljedeći **reagensi (kitovi)**: za **određivanje glukoze u krvi** *Glukoza (PAP)* (Herbos dijagnostika, Hrvatska); u metodi Western blot: za **kemiluminescentnu detekciju proteina** *ECL™ Western Blotting Detection Reagents* (Amersham Biosci, Velika Britanija); u imunohistokemiji: za **blokiranje nespecifičnog vezanja** korišten je *Protein block, Serum-free* (DAKO, SAD), za **vizualizaciju** je korišten *Labeled Streptavidin Biotin (LSAB™) +System-HRP* (DAKO, SAD), a kao **kromogen** *Lyquid DAB+substrate* (DAKO, SAD), te za **protubojanje** *Dako REAL™ Hematoxylin* (DAKO, SAD).

U postupcima imunodetekcije, korištena su sljedeća **antitijela**: **primarna** 1. *Polyclonal Antibody to Clostridium botulinus toxin A* (Acris, Njemačka), 2. *Polyclonal Rabbit Anti Clostridium botulinum Neurotoxin Type A* (Biodesign, SAD), 3. *Polyclonal Rabbit Clostridium botulinum Type A Neurotoxin Light Chain* (Biodesign, SAD); **sekundarno**

Peroxidase Labeled Affinity Purrified Antibody to Rabbit IgG (H+L) (Kirkegaard&Perry Labboratories, SAD).

3.4. Eksperimentalni modeli boli

Ispitivanja antinociceptivnog djelovanja BT-A izvođena su na različitim eksperimentalnim modelima boli (Tablica 10 i 11).

Tablica 10. *Prikaz eksperimentalnih modela nociceptivne, upalne, neuropatske i mišićne boli korištenih u ovom radu*

Vrsta boli	Model
Nociceptivna bol	Akutna osjetljivost na termalni podražaj Akutna osjetljivost na mehanički podražaj Prva faza boli uzrokovane formalinom
Upalna bol	Formalinski test Karagenanski test Kapsaicinski test
Neuropatska bol	Periferna neuropatija Dijabetička neuropatija
Mišićna bol	Kronična mišićna hiperalgezija

3.4.1. Akutna osjetljivost na termalni podražaj – metoda vruće ploče

Osjetljivost na termalni podražaj ispitivana je metodom vruće ploče (*engl*. unilateral hot-plate test), čiji je postupak ponešto modificiran od originalne metode (114) i prilagođen potrebama eksperimenata. Temperatura površine ploče aparata (proizvođača INKO-Medicinski aparati i instrumenti, Hrvatska) bila je 52±0,2 °C. Nakon što je životinja primljena u odgovarajući položaj, desna stražnja šapa stavljena je na vruću ploču. Mjereno je vrijeme latencije u sekundama potrebno da životinja šapu podigne ili povuče sa zagrijane površine. Svakoj životinji izmjerena su vremena latencije tri puta u intervalima od 10 minuta (iz te tri vrijednosti izračunata je srednja vrijednost). Kako bi se spriječilo oštećenje tkiva, maksimalno vrijeme držanja šape na vrućoj ploči bilo je 20 sekundi.

U pokus su bile uključene dvije skupine životinja: jedna, kojoj je 5 dana prije mjerenja jednokratno s.c. u plantarnu površinu stražnje šape injiciran BT-A u dozi 5 i.j./kg i druga, koja je na isti način primila fiziološku otopinu (kontrola). Svaka skupina je imala barem 6 životinja.

3.4.2. Akutna osjetljivost na mehanički podražaj – metoda pritiska šape

Osjetljivost na mehanički podražaj određivana je metodom pritiska šape (*engl*. paw-pressure test), kao što su prvotno opisali Randall i Selitto (115). Aparat za mjerenje načinjen je u našem laboratoriju (prema komercijalnom aparatu *Paw-pressure Analgesia*

Instrument, Ugo Basile, Italija). Nakon što je primljena u odgovarajući položaj, desna stražnja šapa životinje stavljena je na podložak, te je s dorzalne strane vršen pritisak rastućeg intenziteta. Mjerena je sila kojom klizni uteg pritišće površinu šape od oko 6 mm^2. (U fizici bi ispravno označavanje sile bilo u N (Newton), a pritiska u Pa (Pascal = N/m^2). U skladu sa znanstvenom literaturom na engleskom jeziku, koja mjeri „*withdrawal threshold*“ u gramima, sila je, radi jednostavnosti i lakšeg razumijevanja rezultata, u disertaciji izražena kao masa u gramima koja je potrebna da u životinje izazove bol, tj. da štakor s podloška izvuče šapu. Izmjerena masa predstavljala je prag boli. Kako bi se spriječilo oštećenje tkiva, mjerenje je prekinuto kod mase od 250 grama. Svakoj životinji izmjerena je mehanička osjetljivost tri puta u intervalima od 10 minuta (iz te tri vrijednosti izračunata je srednja vrijednost).

U pokus su bile uključene dvije skupine životinja. Jedna, kojoj je 5 dana prije mjerenja jednokratno s.c. u plantarnu površinu stražnje šape injiciran BT-A u dozi 5 i.j./kg i druga, kontrolna, koja je umjesto BT-A primila odgovarajući volumen fiziološke otopine. U svakoj skupini je bilo barem 6 životinja.

3.4.3. Formalinski test

Kako bi se dobila 5%-tna otopina formalina, 35%-tni formaldehid razrijeđen je s fiziološkom otopinom u omjeru 1:7. Formalin (5%-tni) je u volumenu od 50 μL injiciran u plantarnu površinu stražnje desne šape štakora. Kao pokazatelj boli, mjeren je broj trzaja šape tretirane formalinom. Injiciranje formalina uzrokuje u životinja bol koja je obilježena dvjema fazama (116). Mjerenja u prvih 15 minuta nakon injiciranja formalina čine prvu fazu testa, koja je posljedica izravne stimulacije nociceptora formalinom. Ova faza predstavlja nociceptivnu bol. Broj trzaja tretirane šape u sljedećih 45 minuta (15-60 minuta nakon injiciranja formalina) čini drugu fazu testa, koja je posljedica oslobađanja upalnih medijatora i senzitizacije. Ova faza predstavlja upalnu bol (Tablica 11).

Formalinskim testom ispitivana je ovisnost antinociceptivnog učinka BT-A o dozi, te njegovo trajanje nakon periferne i središnje primjene BT-A.

U pokusu ispitivanja ovisnosti učinka o dozi, korištene doze BT-A kod periferne primjene u šapu bile su: 2; 3; 3,5; 5 i 7 i.j./kg, a kod središnje (intratekalne) primjene: 0,25; 0,5; 1 i 1,5 i.j./kg. Kako bi se utvrdio nastup antinociceptivnog djelovanja, mjerenja su provođena najranije 24 sata nakon jednokratne periferne ili središnje primjene BT-A. U pokusu ispitivanja trajanja antinociceptivnog djelovanja, korištena je jedna doza BT-A (7 i.j./kg), a mjerenja su provođena 1 dan, 5, 15, 30 i 37 dana nakon perifernog injiciranja toksina u šapu.

U pokus je bila uključena i kontrolna skupina životinja, kojoj je umjesto BT-A injicirana fiziološka otopina. U skupinama je bilo 6-7 životinja.

3.4.4. Hiperalgezija uzrokovana karagenanom

Otopina karagenana u fiziološkoj otopini (1%), u volumenu od 100 μL, injicirana je u plantarnu površinu stražnje desne šape štakora. Karagenan uzrokuje jaku upalnu reakciju praćenu edemom, te termalnu i mehaničku hiperalgeziju, čiji je intenzitet najjači 2-6 sati nakon injiciranja (Tablica 11) (117,118). BT-A je primijenjen jednokratno periferno u plantarnu površinu stražnje desne šape u dozi 5 i.j./kg 1 dan i 6 dana prije injiciranja karagenana. Tri sata nakon injiciranja karagenana, mjerena je osjetljivost desne šape na

termalni podražaj metodom vruće ploče, odnosno na mehanički podražaj metodom pritiska šape. Nakon što je svakoj životinji izmjereno vrijeme latencije po tri puta u intervalima od 10 minuta, istim životinjama je mjerena osjetljivost na mehanički podražaj tri puta u intervalima od 10 minuta.

U pokusu ispitivanja ovisnosti antinociceptivnog učinka o dozi, i u ovom modelu su korištene doze BT-A: 2; 3; 3,5; 5 i 7 i.j./kg.

U svaki pokus su, pored skupine koja je u plantarnu površinu šape primila BT-A i karagenan, bile uključene i skupina koja je primila fiziološku otopinu i karagenan, te skupina koja je primila samo fiziološku otopinu. U skupinama je bilo 6-7 životinja.

Tablica 11. *Usporedba osobina formalinskog, karagenanskog i kapsaicinskog modela upalne boli*

Model	Osobina	Trajanje
Formalinski test	Dvo-fazični odgovor karakteriziran spontanim bolnim odgovorima, poput trzaja i lizanja injicirane šape	Mjere se bolni odgovori (broj trzaja injicirane šape) u vremenu od 15-60 minuta nakon injiciraja formalina
Hiperalgezija uzrokovana karagenanom	Termalna i mehanička hiperalgezija	2-6 sati nakon injiciranja karagenana upalna reakcija i hiperalgezija su najjačeg intenziteta, te se nakon toga smanjuju unutar 24-72 sata
Hiperalgezija uzrokovana kapsaicinom	Termalna i mehanička hiperalgezija	Termalna i mehanička hiperalgezija nastupaju unutar prvih 15 minuta, a traju 45 minuta (termalna), odnosno do 4 sata (mehanička)

3.4.5. Hiperalgezija uzrokovana kapsaicinom

Kapsaicin je otopljen u fiziološkoj otopini uz dodatak 10% etanola (96%-tni) i 10% Tween 80. Otopina kapsaicina (0,1%) injicirana je u plantarnu površinu stražnje desne šape štakora u volumenu od 50 μL. Već 15 minuta nakon injiciranja, razvija se termalna i mehanička hiperalgezija praćena crvenilom šape kao posljedicom upale (Tablica 11) (119,120). BT-A je, u dozi 5 i.j./kg, injiciran jednokratno periferno u plantarnu površinu desne šape 1 dan i 6 dana prije kapsaicina. Petnaest minuta nakon injiciranja kapsaicina, uslijedilo je mjerenje osjetljivosti desne šape na termalni podražaj metodom vruće ploče (3 puta u intervalima od 10 minuta), odnosno, nakon toga, na mehanički podražaj metodom pritiska šape (3 puta u intervalima od 10 minuta).

U svaki pokus su, pored skupine kojoj je u plantarnu površinu stražnje desne šape injiciran BT-A i kapsaicin, bile uključene i skupina koja je primila fiziološku otopinu i kapsaicin, te skupina koja je injicirana samo s otapalom (fiziološka otopina/10% etanol/10% Tween 80). U skupinama je bilo 5-7 životinja.

3.4.6. Periferna neuropatija

Životinjama je parcijalno jednostrano zarezan *n. ishiadicus*, kao što su prvotno opisali Lindenlaub i Sommer (121). Anesteziranim životinjama izoliran je desni *n. ishiadicus,* te je kroz njegovu sredinu postavljena tanka kirurška igla. Pola promjera živca zarezano je skalpelom u smjeru igle, koja je nakon toga odstranjena. U kontrolne skupine životinja učinjen je „lažni" zahvat, tj. živac je izoliran, ali nije zarezan.

Dva tjedna nakon zahvata, mjerena je osjetljivost desne šape na termalni podražaj metodom vruće ploče, te na mehanički podražaj metodom pritiska šape. Za životinje s parcijalnom transekcijom živca koje su pokazale preosjetljivost (vremena latencije i prag mehaničkog podražaja niži za barem 20% u odnosu na srednju vrijednost kontrole s „lažnim“ zahvatom), smatrano je da su razvile neuropatiju. Te su životinje uključene u daljnje pokuse i injicirane s BT-A ili s fiziološkom otopinom. U jednoj seriji pokusa BT-A je u dozi 7 i.j./kg injiciran jednokratno s.c. u plantarnu površinu stražnje desne šape štakora, a u drugoj intratekalno u dozi 1 i.j./kg. Mjerenja osjetljivosti na termalne i mehaničke podražaje počela su 24 sata nakon primjene BT-A. U pokusu, u kojem je BT-A primijenjen periferno, mjerenja su izvođena jednom tjedno, dok je bila prisutna hiperalgezija, odnosno dok je trajalo djelovanje BT-A.
U pokusu, u kojem je BT-A primijenjen intratekalno, mjerenja su provođena 1 dan i 5 dana nakon primjene BT-A. U skupinama je bilo 5-7 životinja.

3.4.7. Dijabetička neuropatija

Djelovanje BT-A ispitivano je na dva modela eksperimentalnog dijabetesa. U jednom je dijabetes uzrokovan jednokratnim s.c. injiciranjem otopine aloksana u dozi od 150 mg/kg (122), a u drugom i.p. injiciranjem otopine streptozotocina u dozi od 80 mg/kg (123). Jednoj skupini životinja u svakom modelu je na isti način injicirana fiziološka otopina (skupina bez dijabetesa).

Nakon pet dana, životinjama je iz repne vene izvađena krv, kako bi se odredila koncentracija glukoze kolorenzimskom (PAP) metodom. Životinje s koncentracijom glukoze u krvi većom od 15 mM/L uključene su u daljnje pokuse, a tri tjedna nakon injiciranja aloksana, odnosno streptozotocina, mjerena im je osjetljivost na mehanički podražaj metodom pritiska šape.

Za životinje koje su razvile preosjetljivost na mehanički podražaj (prag podražaja niži za barem 25% u odnosu na srednju vrijednost kontrole - skupina bez dijabetesa), smatrano je da su razvile neuropatiju. Te su životinje injicirane jednokratno periferno (s.c. u šapu) s BT-A u dozama 3, 5 ili 7 i.j./kg, odnosno s fiziološkom otopinom. Osjetljivost na mehanički podražaj mjerena je 5 dana nakon primjene BT-A u šapu štakora.

U streptozotocinskom modelu dijabetesa dodatno je ispitivan nastup, te trajanje antinociceptivnog djelovanja periferno primijenjenog BT-A u dozi 5 i.j./kg. Mjerenje osjetljivosti na mehanički podražaj počelo je 1 dan nakon primjene BT-A, a ponovljeno je 5, 15 i 28 dana nakon injiciranja BT-A ili fiziološke otopine u šapu štakora. Na kraju pokusa, životinjama je ponovno izvađena krv iz repne vene, kako bi se provjerila koncentracija glukoze u krvi.

Osjetljivost na kemijski podražaj, u oba modela, mjerena je svim životinjama jednom tijekom pokusa (10-12 dana nakon injiciranja BT-A), i to formalinskim testom.

U skupinama je bilo 5-7 životinja.

3.4.8. Kronična mišićna hiperalgezija

Kisela otopina 0,9% NaCl pH 4,0 u volumenu od 100 μL injicirana je dva puta, u intervalu od 4 dana, u desni *gastrocnemius* mišić životinje. Unutar 24 sata od posljednjeg injiciranja takve otopine, razvija se mehanička hiperalgezija na ipsilateralnoj, ali i na kontralateralnoj strani (sekundarna hiperalgezija) (63). Osjetljivost na mehanički podražaj mjerena je metodom pritiska na tkivu šape s ipsilateralne i s kontralateralne strane.

U prvoj seriji pokusa, BT-A je, u dozi 5 i.j./kg, primijenjen periferno u plantarnu površinu desne stražnje šape štakora 5 dana prije prve injekcije kisele otopine, kako bi se ispitalo da li BT-A sprječava nastanak sekundarne hiperalgezije. Osjetljivost na mehanički podražaj mjerena je 24 sata nakon druge injekcije kisele otopine, odnosno 10 dana nakon BT-A.

U drugoj seriji pokusa, BT-A je injiciran periferno, u dozi 5 i.j./kg, 24 sata nakon druge i.m. injekcije kisele otopine 0,9% NaCl-a, kako bi se ispitalo njegovo djelovanje na već nastalu preosjetljivost. U ovom je pokusu osjetljivost na mehanički podražaj mjerena obostrano, i to 1 i 5 dana nakon injiciranja BT-A.

U svaku seriju pokusa, osim skupine koja je i.m. injicirana s kiselom otopinom 0,9% NaCl-a pH 4,0 i s.c. (u šapu) s BT-A, bile su uključene i skupina koja je i.m. injicirana s kiselom otopinom, a u šapu je primila fiziološku otopinu, te skupina koja je i.m. i s.c. injicirana samo s fiziološkom otopinom (kontrola). U svakoj je skupini bilo 6 životinja.

3.5. Određivanje veličine edema šape nakon injiciranja karagenana

Edem, uzrokovan injiciranjem 1%-tne otopine karagenana u volumenu od 100 μL u plantarnu površinu stražnje desne šape, mjeren je slično opisu Wintera još iz 1962. godine (124). Aparat za mjerenje načinjen je u našem laboratoriju prema komercijalnom aparatu (*Plethysmometer - Paw volume meter*, Ugo Basile, Italija). U lijevu je šapu injiciran isti volumen otapala (fiziološke otopine). Tri sata nakon injiciranja karagenana, životinja je primljena u odgovarajući položaj, a desna i lijeva šapa su naizmjence uronjene, do zgloba, u usku graduiranu posudicu napunjenu 70%-tim etanolom. Očitana je promjena u volumenu tekućine (u mililitrima) nakon uranjanja šape. Mjerenje je ponovljeno još dva puta (iz tri očitane vrijednosti izračunata je srednja vrijednost). Nakon toga, životinje su žrtvovane cervikalnom dislokacijom, šape su amputirane u području koljena i izvagane.

U pokus su uključene dvije skupine. Prva, kojoj je 5 dana prije karagenana jednokratno periferno u desnu šapu injiciran BT-A u dozi 5 i.j./kg i druga, kojoj je na isti način primijenjena fiziološka otopina (kontrola). U skupinama je bilo 6-7 životinja.

3.6. Mjerenje ekstravazacije proteina nakon injiciranja upalnih tvari u šapu štakora

Injiciranjem kapsaicina u plantarnu površinu stražnje šape štakora uzrokovana je lokalna upalna reakcija karakterizirana malim edemom i crvenilom šape (125,126). Patofiziološki, to je praćeno izlaženjem proteina iz krvnih žila (ekstravazacija). Do ekstravazacije proteina dolazi i pri upali uzrokovanoj karagenanom. Jedan od najčešćih načina mjerenja ekstravazacije je pomoću boje koja se veže za albumine i prilikom upale, zajedno s njima, izlazi iz krvnih žila.

U jednoj seriji pokusa je anesteziranim životinjama, 15 minuta nakon injiciranja otopine Evansovog modrila (50 mg/kg, u volumenu od 1 mL) u venu repa, injicirana 0,1%-tna otopina kapsaicina u volumenu od 100 μL u plantarnu površinu stražnje desne šape, odnosno isti volumen otapala (fiziološka otopina koja sadrži 10% etanola (96%-tog) i 10% Tween 80) u kontralateralnu šapu. Nakon sljedećih 15 minuta, šape su amputirane u području koljena, izvagane, fotografirane, stavljene u formamid (4 mL po šapi), te ostavljene na 37 °C tijekom 48 sati. Nakon toga, mjerena je apsorbancija otopina formamida na 620 nm.

U drugom pokusu mjerenja ekstravazacije proteina, 1%-tna otopina karagenana u volumenu od 100 μL injicirana je u stražnju desnu šapu štakora, a otapalo (fiziološka otopina) u drugu. Nakon tri sata, otopina Evansovog modrila injicirana je u repnu venu anesteziranih štakora, te se postupilo kao što je prethodno navedeno.

U pokus je, osim skupine životinja kojoj je 5 dana prije injiciranja upalnih tvari u istu šapu injiciran BT-A u dozama 5 ili 10 i.j./kg, uključena i skupina kojoj je umjesto BT-A injicirana fiziološka otopina. Mjera ekstravazacije pri upali su izmjerene apsorbancije otopina formamida (prikazane po gramu tkiva šape). U skupinima je bilo 6-8 životinja.

3.7. Određivanje djelovanja botulinum toksina tipa A nakon inhibicije aksonalnog transporta

3.7.1. Inhibicija aksonalnog transporta kolhicinom

Otopina kolhicina u fiziološkoj otopini (5 mM), u volumenu od 2 μL, injicirana je u *n. ishiadicus* životinje. Nakon primjene u ili na živac u malim koncentracijama, kolhicin uzrokuje depolimerizaciju tubulina i tako sprječava aksonalni transport (127). Anesteziranim životinjama je zarezana koža uz desnu bedrenu kost kako bi se izolirao *n. ishiadicus*. Ispod živca je stavljen komadić parafilma, da se spriječi gubitak otopine kolhicina (ili fiziološke otopine) uslijed mogućeg krivog injiciranja. Jednu minutu nakon injiciranja, parafilm je uklonjen, rezovi su sašiveni i životinje su vraćene u kaveze.

BT-A u dozi 5 i.j./kg je injiciran s.c. u plantarnu površinu stražnje desne šape štakora 24 sata nakon injiciranja kolhicina u živac.

Provedena su dva neovisna pokusa: jedan, na modelu upalne boli uzrokovane karagenanom, te drugi, na modelu kronične mišićne hiperalgezije.

U plantarnu površinu stražnje desne šape štakora injicirana je i 1%-tna otopina karagenana, i to 5 dana nakon periferne primjene BT-A. Osjetljivost na termalni i mehanički podražaj mjerena je nakon 3 sata metodom vruće ploče, odnosno metodom pritiska šape. U ovaj su

pokus bile uključene sljedeće skupine životinja: 1. skupina kojoj je u živac i u šapu injicirana fiziološka otopina, 2. skupina kojoj je u živac injicirana fiziološka otopina, a u šapu fiziološka otopina i karagenan, 3. skupina kojoj je u živac injicirana fiziološka otopina, a u šapu BT-A i karagenan; 4. skupina kojoj je u živac injiciran kolhicin, a u šapu BT-A i karagenan, te 5. skupina kojoj je u živac injiciran kolhicin, a u šapu fiziološka otopina i karagenan. U skupinama je bilo 4-6 životinja.

U drugom pokusu, životinje su najprije injicirane dva puta s kiselom otopinom 0,9% NaCl-a pH 4,0 (četiri dana razmaka između prve i druge injekcije) u desni *gastrocnemius* mišić, a 24 sata nakon druge i.m. injekcije, anesteziranim životinjama je u desni *n. ishiadicus* injiciran kolhicin. Jednoj skupini životinja je sljedeći dan periferno primijenjen BT-A u dozi 5 i.j./kg u plantarnu površinu šape, dok je drugoj skupini injicirana fiziološka otopina. Osjetljivost na mehanički podražaj mjerena je metodom pritiska šape 5 dana nakon injiciranja BT-A, i to na ispilateralnoj i kontralateralnoj strani. U ovaj su pokus bile uključene sljedeće skupine životinja: 1. skupina koja je u živac, mišić i šapu primila samo fiziološku otopinu, 2. skupina koja je i.m. injicirana s kiselom otopinom 0,9% NaCl-a, a u živac i šapu je primila fiziološku otopinu, 3. skupina koja je i.m. injicirana s kiselom otopinom, u živac je injicirana fiziološka otopina, a u šapu BT-A. Životinjama u sljedeće dvije skupine (četvrta i peta skupina) u *n. ishiadicus* je injicirana otopina kolhicina i obje su i.m. injicirane s kiselom otopinom 0,9% NaCl-a. Dok je jednoj u desnu šapu injiciran BT-A 1 dan nakon kolhicina, drugoj je skupini injiciran isti volumen fiziološke otopine. U svakoj je skupini bilo najmanje 5 životinja.

3.7.2. Inhibicija aksonalnog transporta presijecanjem n. ishiadicusa

Životinje, koje su nakon dvostrukog i.m injiciranja kisele otopine 0,9% NaCl-a pH 4,0 razvile preosjetljivost na mehanički podražaj na injiciranoj i na suprotnoj strani, bile su podvrgnute sljedećem postupku. U desni *n. ishiadicus* anesteziranih životinja injiciran je BT-A u dozi 0,5 i.j./kg (ili fiziološka otopina) u volumenu od 2 μL, te je nakon 1 minute živac ispod mjesta injiciranja prerezan. Osjetljivost na mehanički podražaj mjerena je metodom pritiska šape na kontralateralnoj strani 8, 16, 30, 45, 53 i 68 sati nakon injiciranja BT-A.

U pokus su bile uključene sljedeće skupine životinja: 1. skupina kojoj je u živac i mišić injicirana fiziološka otopina, 2. skupina kojoj je i.m. injicirana kisela otopina, u živac fiziološka otopina, te je živac prerezan i 3. skupina kojoj je i.m. injicirana kisela otopina, a u živac BT-A, nakon čega je živac distalno prerezan. U svakoj skupini je bilo 8 životinja.

3.8. Metode imunodetekcije botulinum toksina tipa A

3.8.1. Priprema uzoraka za imunodetekciju

Jedan, tri i pet dana nakon jednokratne s.c. primjene BT-A u dozi 7 i.j./kg u šapu štakora, životinje su žrtvovane cervikalnom dislokacijom, te su im odstranjeni *n. ishiadicus* i senzorni gangliji. Kontrolne uzorke činili su *n. ishiadicus* i senzorni gangliji životinja koje su injicirane s fiziološkom otopinom. Uzorci živaca za Western blot metodu zamrznuti su, i naknadno homogenizirani u odgovarajućem puferu, dok su uzorci živaca i senzornih ganglija za imunohistokemiju stavljeni u puferiranu otopinu formalina, uklapani u

parafinske kocke, te naknadno podvrgnuti odgovarajućim postupcima imunodetekcije BT-A.

3.8.2. Imunohistokemija

Postupak

I. Fiksiranje uzoraka senzornih ganglija i *n. ishiadicusa* u puferiranoj otopini formalina 24 sata

II. Uklapanje u parafinske kocke, rezanje i hvatanje na stakalca

KORAK:	**KEMIKALIJE:**	**VRIJEME:**
1. Deparafinizacija	Histoclear	2x10'
	100% etanol	2x5'
	96% etanol	1x5'
	Destilirana voda	5x
2. Inhibicija endogene peroksidaze	3%H_2O_2/metanol	20'
3. Ispiranje vodom i puferom	Tris pufer (TBS – Tris Buffered Saline)	5'
4. Blokiranje nespecifičnog vezanja	Protein Block, Serum-free	30'
5. Primarno antitijelo	Razrjeđenja antitijela:	60'
U postupcima su korištena tri različita antitijela:		
I. *Polyclonal Antibody to Clostridium botulinus toxin A* (Acris, Njemačka);	I. antitijelo 1:20	
II. *Polyclonal Rabbit Anti Clostridium botulinum Neurotoxin Type A* (Biodesign, SAD);	II. antitijelo1:20	
III. *Polyclonal Rabbit Clostridium botulinum Type A Neurotoxin Light Chain* (Biodesign, SAD)	III. antitijelo1:50	
6. Ispiranje	TBS	5'
7. Sekundarno antitijelo	Biotin-Anti-Rabbit IgG	15'
8. Ispiranje	TBS	5'
8. Tercijarno antitijelo	Streptavidin-peroksidaza (HRP)	15'
9. Ispiranje	TBS	5'
10. Kromogen	Diaminobenzidin (DAB)	do smeđe boje
11. Kontrastno bojanje	Hematoksilin	1'
12. Ispiranje	Voda	po potrebi
13. Pokrivanje stakala	Glicerin-želatina	

Tkiva *n. ishiadicusa* i senzornih ganglija životinja tretiranih s BT-A su, nakon fiksiranja u formalinu, uklopljena u parafinske kocke, rezana na tanke rezove (debljine 8 μm), te, nakon postupaka deparafinizacije, inhibicije endogene peroksidaze i blokiranja nespecifičnog vezanja, inkubirana u otopini primarnog antitijela. Slijedila je inkubacija u otopini sekundarnog antitijela, vezanom za biotin, te otopini streptavidina, vezanom s peroksidazom iz hrena (HRP – horseradish peroxidase). Slijedilo je bojanje s DAB-om i „protubojanje“ s hematoksilinom. Svaki uzorak tkiva tijekom postupka je imao negativnu kontrolu - tkivo tretirano na isti način kao i ostali uzorci, ali bez izlaganja primarnom antitijelu. Uzorci su promatrani mikroskopski.

3.8.3. Western blot metoda

Postupak

I. Homogeniziranje uzoraka *n. ishiadicusa* u puferu za homogeniziranje

II. Priprema 9%-tnog donjeg i gornjeg SDS-PAGE (*engl*. **S**odim **D**odecyl **S**ulphate-**P**oly**A**crylamide **G**el **E**lectrophoresis) gela

III. Nanošenje uzoraka na gel (10 μl)

KORAK:	**KEMIKALIJE:**	**VRIJEME:**
1. Elektroforeza proteina na 150V	9% SDS-PAGE gel, uz pufer za razdvajanje	60-75'
2. Prijenos na membrane na 100 V	Pufer za prijenos pH 8,8	60'
3. Bojanje membrana	Ponceau boja	3-5'
4. Ispiranje membrana	TBS	3x5'
5. Blokiranje nespecifičnog vezanja	TBS/5% nemasno mlijeko/0,5%Tween 20	60'
6. Ispiranje membrana	TBS/0,5% Tween 20	3x10'
7. Inkubacija u primarnom antitijelu:	Razrjeđenja antitijela u puferu za blokiranje:	60'
I. *Polyclonal Antibody to Clostridium botulinus toxin A* (Acris, Njemačka);	I. antitijelo 1:500 i 1:1000	
II. *Polyclonal Rabbit Anti Clostridium botulinum Neurotoxin Type A* (Biodesign, SAD);	II. antitijelo 1:1000	
III. *Polyclonal Rabbit Clostridium botulinum Type A Neurotoxin Light Chain* (Biodesign, SAD)	III. antitijelo 1:350	
8. Ispiranje membrana	TBS/0,5 % Tween 20	3x10'
9. Inkubacija u sekundarnom antitijelu „Peroxidase Labeled Affinity Purified Antibody to Rabbit IgG“	Razrjeđenje antitijela u puferu za blokiranje 1:1000	60'
10. Ispiranje membrana	TBS/0,5% Tween 20	3x10'
	TBS	3x10'
11. Izlaganje kemiluminescentu	Luminol	3'
12. Ekspozicija	Fiksiranje i razvijanje na film	5-10'

Nakon elektroforeze proteina iz tkiva *n. ishiadicusa* na 9% SDS-PAGE gelu uz pufer za razdvajanje pH 8,3 i prijenosa na nitrocelulozne membrane uz pufer za prijenos (128), slijedilo je blokiranje membrana i inkubacija u otopinama primarnog antitijela i sekundarnog antitijela - vezanom na peroksidazu iz hrena. Nakon ispiranja u puferu (pH 7,4), membrane su inkubirane u otopini kemiluminescenta, pri čemu dolazi do oksidacije luminola katalizirane peroksidazom iz hrena, te emisije svjetla koje se hvata na filmu.

Pufer za homogeniziranje uzoraka:
50 mM HEPES
150 mM NaCl
1 mM EDTA
10% glicerol
1% Triton V-100

25 mM NaF
10μM $ZnCl_2$
1 mM PMSF

DONJI GEL (SEPARATING) 9% sastoji se od:
Tris Cl/SDS pH 8,8
30 % acrilamid/0,8% bisakrilamid
10 % amonij-persulfat
TEMED (**TE**tra**M**ethyl**E**thylene**D**iamine)
H_2O

GORNJI GEL sastoji se od:
30% akrilamid/0,8% bisakrilamid
Tris Cl/SDS pH 6,8
10% amonij persulfat
TEMED

TBS (Tris pufer)
0,5 mM Tris baza
7,5 mM NaCl
pH 7,4

3.9. Statistička obrada rezultata

Rezultati pokusa na eksperimentalnim modelima boli na životinjama izraženi su kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. Rezultati iz nekoliko pokusa prikazani su kao postotak promjene u odnosu na kontrolnu skupinu. Nakon analize varijance, razlike između skupina analizirane su Newman-Keuls *post hoc* testom. Značajne su sve p vrijednosti manje od 0,05, osim u slučaju višekratnih mjerenja gdje je, uz faktor korekcije, granica značajnosti pomaknuta s uobičajenih 0,05 na 0,01.

4. REZULTATI

4.1. Djelovanje botulinum toksina tipa A na različite vrste boli

4.1.1. Nociceptivna bol

BT-A, primijenjen u plantarnu površinu stražnje šape štakora 5 dana prije mjerenja u dozi od 5 i.j./kg, nije mijenjao vrijeme latencije mjereno metodom vruće ploče, niti je utjecao na prag osjetljivosti na mehanički podražaj mjeren metodom pritiska šape. Vrijeme latencije, tj. vrijeme potrebno da životinja šapu povuče ili podigne s vruće ploče, bilo je za skupinu tretiranu s BT-A 8,2±2,3 sekundi, te za kontrolu koja je primila fiziološku otopinu 7,9±3,4 sekundi. Prag osjetljivosti na mehanički podražaj, tj. najmanja sila kojom uteg pritišće šapu na površini oko 6 mm^2 (zbog jednostavnosti je izražena u jedinici mase umjesto u jedinici sile), bila je 152,7±31,8 grama za skupinu tretiranu s BT-A te 147,8±35,3 grama za kontrolnu skupinu životinja. BT-A (5 i.j./kg) nije utjecao niti na bolne odgovore (broj trzaja formalinom-tretirane šape) u prvoj fazi formalinskog testa (prvih 15 minuta nakon injiciranja formalina), koja je posljedica akutnog podražaja nociceptora formalinom. Broj trzaja formalinom-tretirane šape bio je: 117,0±22,1 za kontrolu *vs*. 106,0±22,8 za BT-A (rezultati su prikazani kao aritmetička sredina±standardna devijacija).

Razlika između skupina tretiranih s BT-A i kontrolnih grupa životinja nije bila statistički značajna niti u jednom testu.

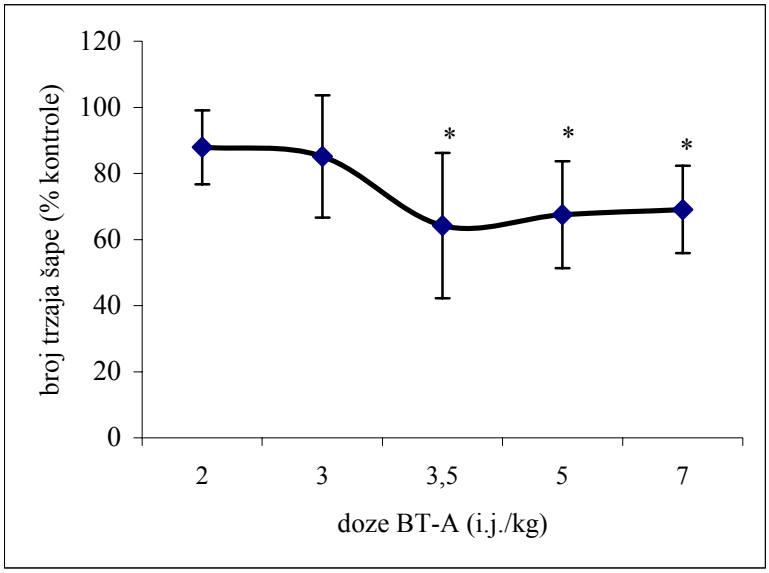
4.1.2. Upalna bol

4.1.2.1. Formalinski test

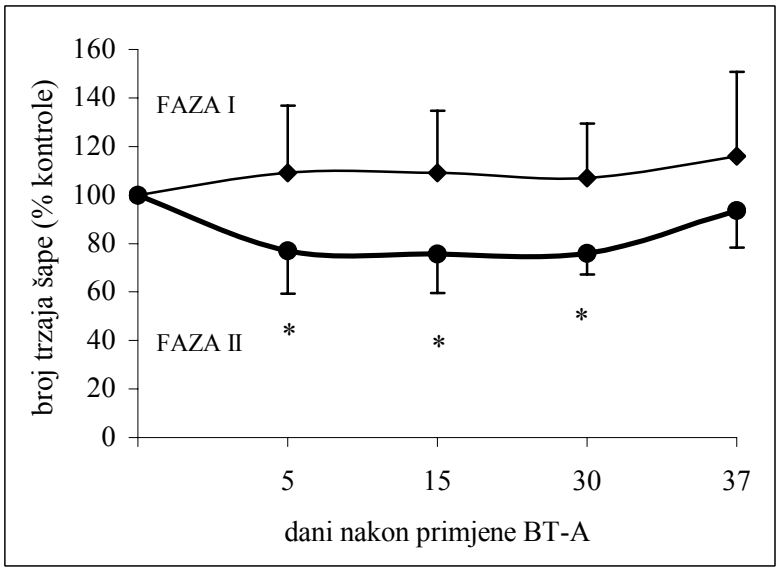
Formalinskim testom se ispitivao utjecaj BT-A na upalnu bol (druga faza testa), pri čemu je mjeren broj bolnih odgovora (trzaja tretirane šape) 15-60 minuta nakon injiciranja formalina. Ispitivalo se postoji li ovisnost antinociceptivnog učinka o dozi, te koliko dugo učinak traje.

Pri ispitivanju najmanje djelotvorne doze, te ovisnosti učinka o dozi, BT-A (2; 3; 3,5; 5 i 7 i.j./kg) je primijenjen jednokratno s.c. u plantarnu površinu stražnje šape štakora 5 dana prije mjerenja. Pokazano je da je najmanja doza koja statistički značajno smanjuje broj trzaja šape injicirane formalinom u odnosu na kontrolu (životinje koje su primile fiziološku otopinu) doza od 3,5 i.j./kg (Slika 6). Nije uočeno dodatno povećanje učinka primjenom doza većih od 3,5 i.j./kg, tj. nije bilo razlike u intenzitetu antinociceptivnog djelovanja.

Rezultati ispitivanja vremena početka antinociceptivnog djelovanja jednokratno primijenjenog BT-A (7 i.j./kg) pokazali su da ono nastupa tek 5 dana nakon njegova perifernog injiciranja u šapu štakora, te je još uvijek prisutno 15 i 30 dana nakon primjene. Broj trzaja formalinom injicirane šape, mjeren 37 dana nakon primjene BT-A, nije bio značajno različit od kontrole (Slika 7).



Slika 6. ***Utjecaj rastućih doza jednokratno primijenjenog BT-A u plantarnu površinu stražnje šape na formalinom uzrokovanu bol (broj trzaja šape) u drugoj fazi formalinskog testa.*** *Mjerenja su izvođena 5 dana nakon primjene BT-A. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina postotka smanjenja broja trzaja šapa injiciranih formalinom u odnosu na aritmetičku sredinu kontrole± standardna devijacija; n=6-7; *p<0,001 u usporedbi s kontrolom koja je primila fiziološku otopinu; vrijednost kontrole (tijekom 45 minuta) (aritmetička sredina±standardna devijacija): 282,5±40,4 trzaja tretirane šape.*

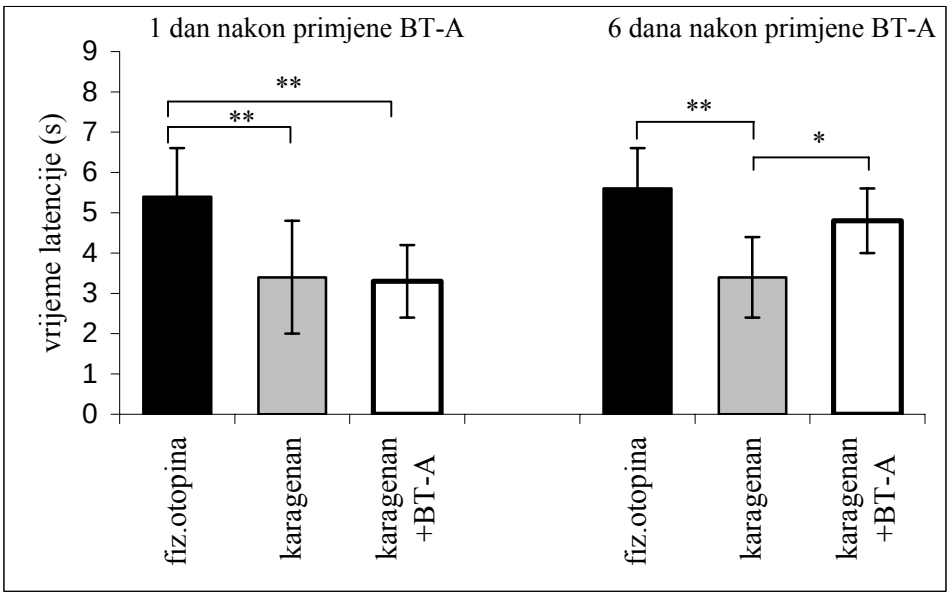


Slika 7. ***Antinociceptivno djelovanje jednokratno primijenjenog BT-A (7 i.j./kg) u plantarnu površinu stražnje šape štakora u formalinskom testu, mjereno u različitim vremenima nakon primjene.*** *Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina postotka smanjenja broja trzaja šapa injiciranih formalinom u odnosu na kontrolu±standardna devijacija; n=6-7; *p<0,001 u usporedbi s kontrolom koja je primila fiziološku otopinu; vrijednosti kontrole (na slici prikazane kao 100%): tijekom prvih 15 minuta (faza I) 117,0±22,1 trzaja šape tretirane formalinom; tijekom sljedećih 45 minuta (faza II) 282,5±40,4 trzaja šape tretirane formalinom (aritmetička sredina±standardna devijacija).*

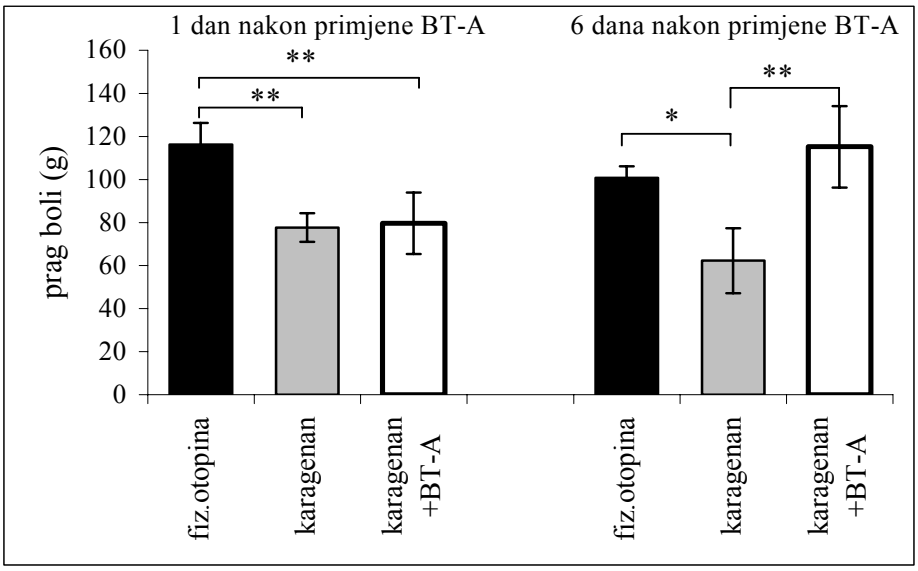
4.1.2.2. Hiperalgezija uzrokovana karagenanom i kapsaicinom

U oba modela upalne boli injiciranje otopina karagenana, odnosno kapsaicina, uzrokovalo je povećanu osjetljivost na termalni podražaj (termalna hiperalgezija), mjereno metodom vruće ploče, te preosjetljivost na mehanički podražaj (mehanička hiperalgezija), mjereno metodom pritiska šape, u odnosu na životinje koje su umjesto karagenana primile fiziološku otopinu (Slika 8 i 9), odnosno otapalo (fiziološka otopina/10% etanol/ 10% Tween 80) umjesto kapsaicina (Slika 10 i 11). Za razliku od karagenanskog testa gdje je vrijeme latencije skupine tretirane karagenanom i fiziološkom otopinom bilo statistički značajno kraće u odnosu na vrijeme latencije skupine tretirane samo s fiziološkom otopinom (Slika 8), u kapsaicinskom testu vrijeme latencije skupine tretirane kapsaicinom i fiziološkom otopinom nije bilo statistički značajno različito u odnosu na skupinu tretiranu otapalom (p=0,067) (Slika 10). BT-A je, nakon periferne primjene u šapu štakora u dozi od 5 i.j./kg 6 dana prije uzrokovanja boli, značajno smanjio ili u potpunosti spriječio nastanak termalne i mehaničke hiperalgezije u oba modela upalne boli. Međutim, BT-A nije utjecao na termalnu niti na mehaničku hiperalgeziju ako je primijenjen 1 dan prije upalnih tvari (Slika 8 i 9, Slika 10 i 11).

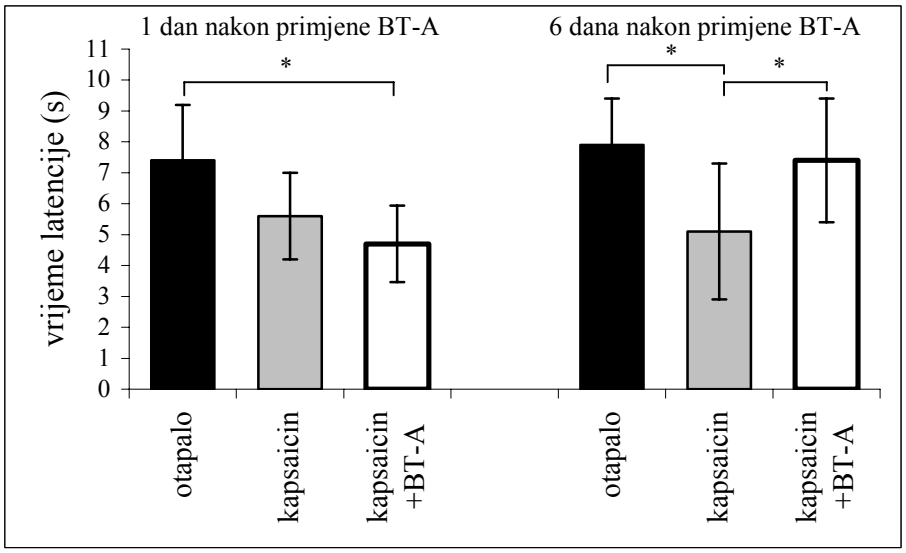
U pokusu ispitivanja ovisnosti antinociceptivnog djelovanja o dozi, kao i u formalinskom testu, najmanja djelotvorna doza koja je statistički značajno smanjila hiperalgeziju uzrokovanu karagenanom bila je 3,5 i.j./kg (129).



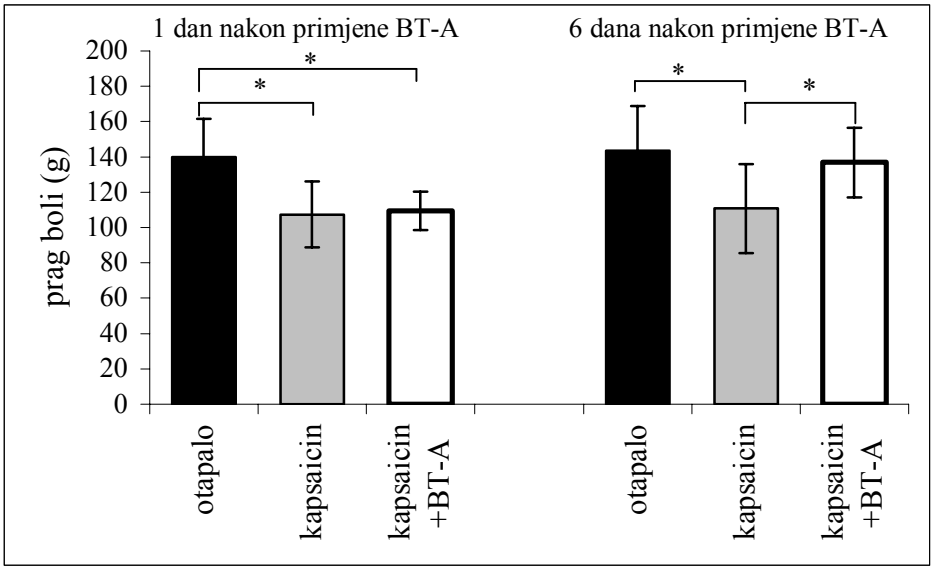
Slika 8. ***Utjecaj jednokratne primjene BT-A (5 i.j./kg) u plantarnu površinu šape štakora na preosjetljivost na termalni podražaj u modelu karagenanom uzrokovane upalne boli.*** *Mjereno je vrijeme potrebno da životinja povuče šapu s vruće ploče (vrijeme latencije). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina± standardna devijacija, n=6-7;* ***fiz. otopina*** *- skupina koja je u šapu primila samo fiziološku otopinu;* ***karagenan*** *- skupina koja je u šapu primila 1% karagenan i fiziološku otopinu;* ***karagenan + BT-A*** *- skupina koja je u šapu primila 1% karagenan i BT-A; *p<0,05; ** p<0,01.*



Slika 9. ***Utjecaj jednokratne primjene BT-A (5 i.j./kg) u plantarnu površinu šape štakora na preosjetljivost na mehanički podražaj u modelu karagenanom uzrokovane upalne boli.*** *Mjerena je sila kojom uteg pritišće površinu šape od oko 6 mm^2, a koja dovede do pomaka šape, tj. bolnog odgovora. Ta vrijednost predstavlja prag boli, a radi jednostavnosti prikazana je kao masa u gramima. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina±standardna devijacija, n=6-7;* ***fiz. otopina*** *- skupina koja je u šapu primila samo fiziološku otopinu;* ***karagenan*** *- skupina koja je u šapu primila 1% karagenan i fiziološku otopinu;* ***karagenan + BT-A*** *- skupina koja je u šapu primila 1% karagenan i BT-A; *p<0,01;**p<0,001.*



Slika 10. ***Utjecaj jednokratne primjene BT-A (5 i.j./kg) u plantarnu površinu šape štakora na preosjetljivost na termalni podražaj u modelu kapsaicinom uzrokovane upalne boli.*** *Mjereno je vrijeme potrebno da životinja povuče šapu s vruće ploče (vrijeme latencije). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina±standardna devijacija, n=5-7;* ***otapalo*** *- skupina koja je u šapu primila samo otapalo (fiz. otopina/10% etanol/10% Tween 80);* ***kapsaicin*** *- skupina koja je u šapu primila 0,1% kapsaicin i fiziološku otopinu;* ***kapsaicin + BT-A*** *- skupina koja je u šapu primila 0,1% kapsaicin i BT-A; *p<0,05.*

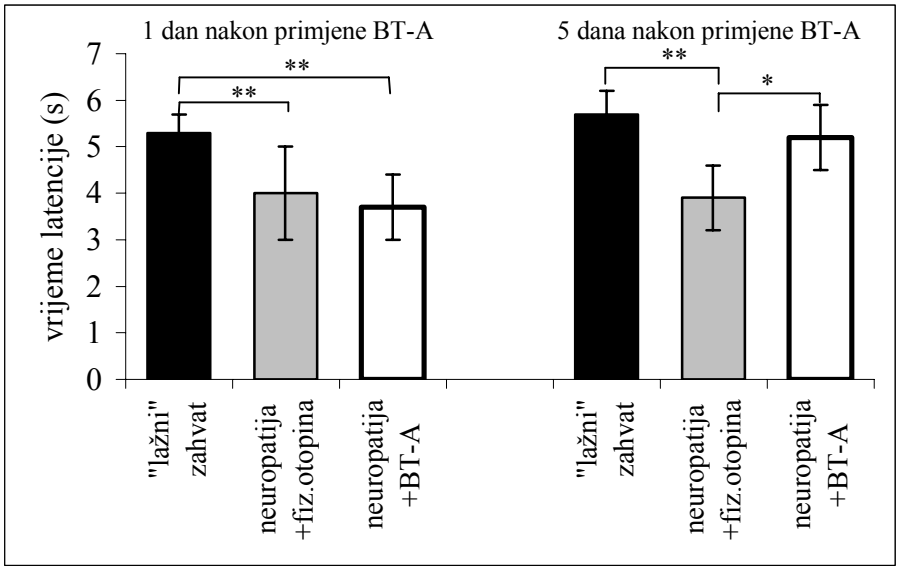


Slika 11. ***Utjecaj jednokratne primjene BT-A (5 i.j./kg) u plantarnu površinu šape štakora na preosjetljivost na mehanički podražaj u modelu kapsaicinom uzrokovane upalne boli****. Mjerena je sila kojom uteg pritišće površinu šape od oko 6 mm^2, a koja dovede do pomaka šape, tj. bolnog odgovora. Ta vrijednost predstavlja prag boli, a radi jednostavnosti prikazana je kao masa u gramima. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina±standardna devijacija, n=5-7;* ***otapalo*** *- skupina koja je u šapu primila samo otapalo (fiz. otopina/10% etanol/10% Tween 80);* ***kapsaicin*** *- skupina koja je u šapu primila 0,1% kapsaicin i fiziološku otopinu;* ***kapsaicin + BT-A*** *- skupina koja je u šapu primila 0,1% kapsaicin i BT-A; *p<0,05.*

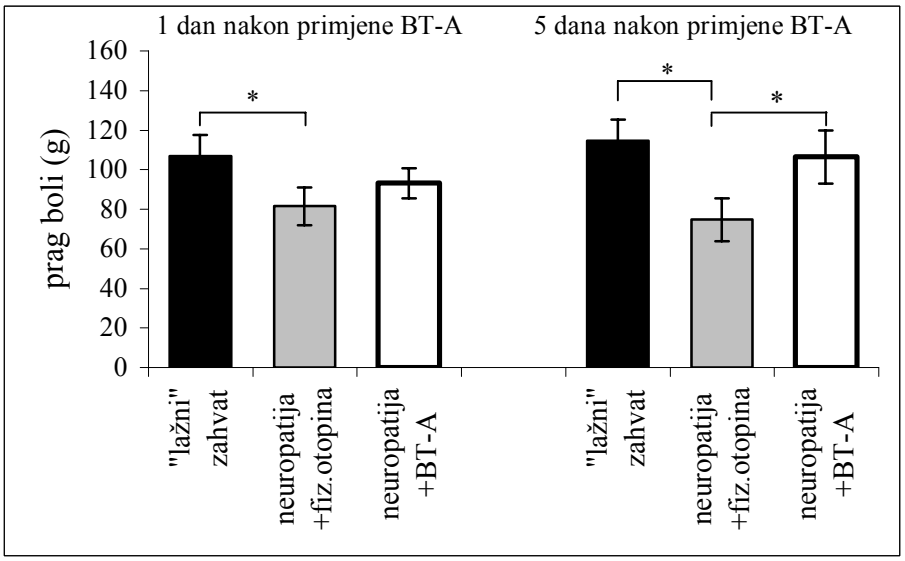
4.1.3. Neuropatska bol

4.1.3.1. Periferna neuropatija

Na modelu eksperimentalne periferne neuropatije ispitivano je djeluje li BT-A nakon jednokratne periferne primjene u plantarnu površinu šape štakora na ovu vrstu boli, koliko dugo mogući učinak traje te kakvog je intenziteta. Dva tjedna nakon djelomične transekcije *n. ishiadicusa* životinje s eksperimentalnom neuropatskom boli razvile su preosjetljivost na termalni podražaj, te na mehanički podražaj. Vrijeme latencije, mjereno metodom vruće ploče, te prag mehaničkog podražaja, mjeren metodom pritiska šape, bili su značajno niži u odnosu na kontrolne životinje s „lažnim“ zahvatom (kojima nije zarezan živac). BT-A je, nakon jednokratne periferne primjene u dozi od 7 i.j./kg u plantarnu površinu stražnje šape štakora, smanjio ili u potpunosti uklonio termalnu i mehaničku preosjetljivost u odnosu na skupinu s neuropatijom koja je u šapu injicirana s fiziološkom otopinom (Slika 12 i 13). Statistički značajno antinociceptivno djelovanje postignuto je 5 dana nakon primjene BT-A i trajalo je 15 dana (130).



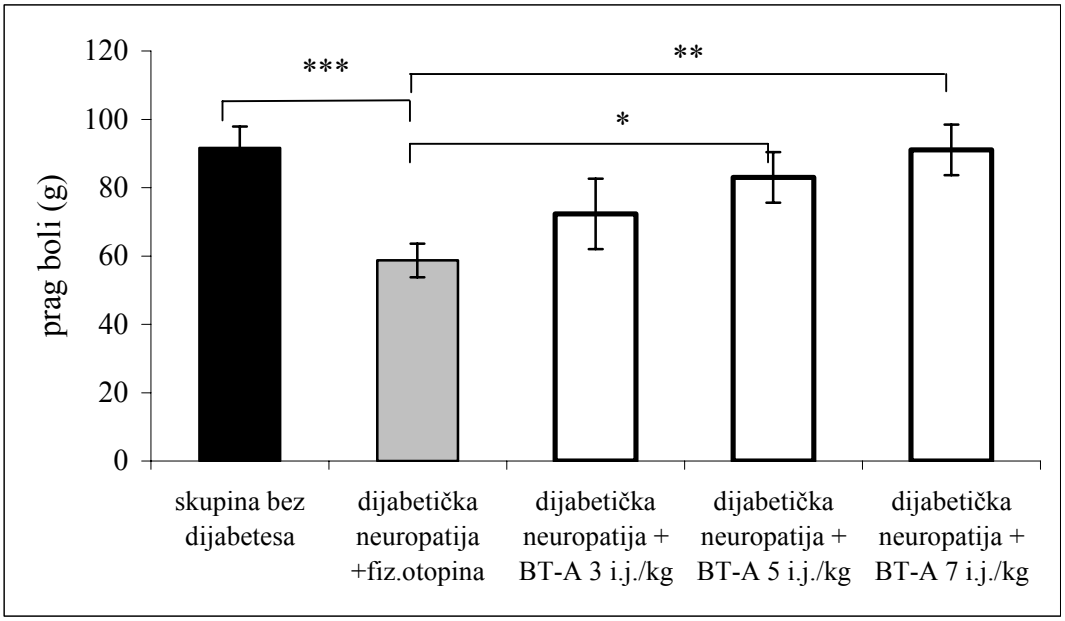
Slika 12. ***Utjecaj jednokratne primjene BT-A (7 i.j./kg) u plantarnu površinu šape štakora na preosjetljivost na termalni podražaj u modelu periferne neuropatije nakon parcijalne transekcije n. ishiadicusa***. *Mjereno je vrijeme potrebno da životinja šapu povuče ili podigne s vruće ploče (vrijeme latencije). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina±standardna devijacija, n=5-7;* ***„lažni" zahvat*** *- skupina bez zarezivanja živca;* ***neuropatija + fiz. otopina*** *- skupina sa zarezanim živcem i neuropatijom, koja je u šapu primila fiziološku otopinu;* ***neuropatija + BT-A*** *- skupina sa zarezanim živcem i neuropatijom, koja je u šapu primila BT-A; *p<0,05; **p<0,01.*



Slika 13. ***Utjecaj jednokratne primjene BT-A (7 i.j./kg) u plantarnu površinu šape štakora na preosjetljivost na mehanički podražaj u modelu periferne neuropatije nakon parcijalne transekcije n. ishiadicusa.*** *Mjerena je sila kojom uteg pritišće površinu šape od oko 6 mm^2, a koja dovede do pomaka šape, tj. bolnog odgovora. Ta vrijednost predstavlja prag boli, a radi jednostavnosti prikazana je kao masa u gramima. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina±standardna devijacija, n=5-7;* ***„lažni" zahvat*** *– skupina bez zarezivanja živca;* ***neuropatija + fiz. otopina*** *- skupina sa zarezanim živcem i neuropatijom, koja je u šapu primila fiziološku otopinu;* ***neuropatija + BT-A*** *- skupina sa zarezanim živcem i neuropatijom, koja je u šapu primila BT-A; *p<0,01.*

4.1.3.2. Dijabetička neuropatija

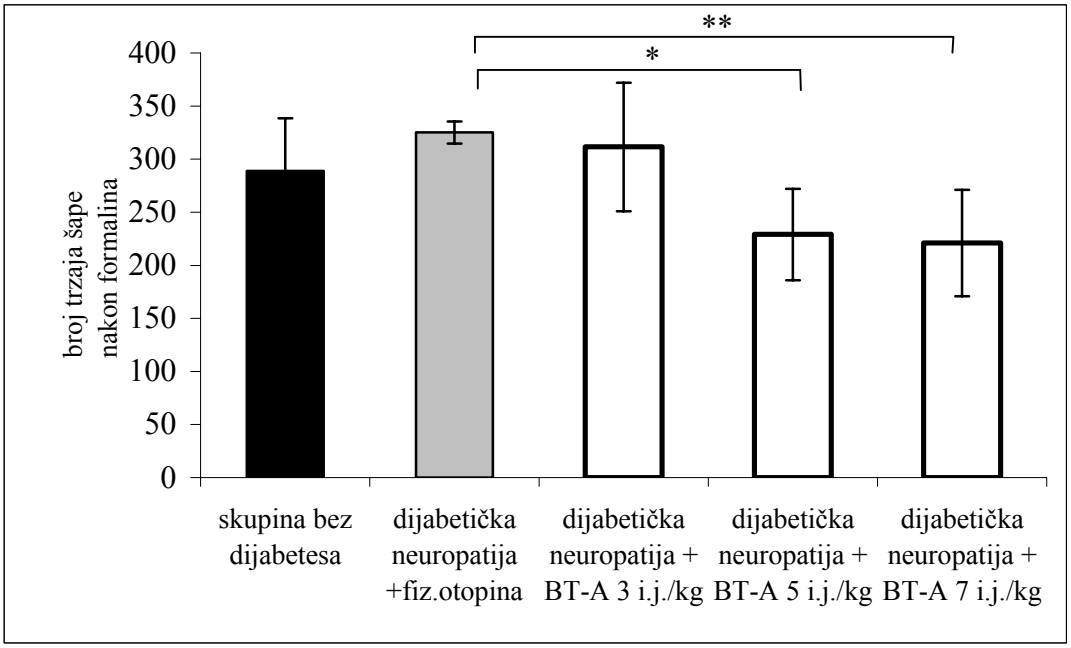
Tri tjedna nakon s.c. injiciranja aloksana (140 mg/kg) 26 od 52 životinje s dijabetesom (koncentracija glukoze u krvi >15 mmol/L) razvile su povećanu osjetljivost na mehanički podražaj (dijabetička neuropatija), mjerenu metodom pritiska šape, u odnosu na životinje koje nisu injicirane s aloksanom (skupina bez dijabetesa). BT-A, primijenjen jednokratno s.c. u plantarnu površinu stražnje šape štakora u dozama 5 i 7 i.j./kg, je smanjio preosjetljivost na mehanički podražaj, mjereno5 dana nakon njegova perifernog injiciranja (Slika 14).



Slika 14. ***Utjecaj jednokratne primjene rastućih doza BT-A u platarnu površinu šape štakora na preosjetljivost na mehanički podražaj u modelu dijabetičke neuropatije uzrokovane aloksanom***. *Prikazani su rezultati mjerenja 5 dana nakon injiciranja BT-A ili fiziološke otopine u šapu životinja. Mjerena je sila kojom uteg pritišće površinu šape od oko 6 mm^2, a koja dovede do pomaka šape, tj. bolnog odgovora. Ta vrijednost predstavlja prag boli, a radi jednostavnosti prikazana je kao masa u gramima. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina±standardna devijacija, n=5-7;* ***skupina bez dijabetesa*** *– skupina koja nije injicirana aloksanom;* ***dijabetička neuropatija + fiz. otopina*** *- skupina s dijabetičkom neuropatijom koja je u šapu primila fiziološku otopinu;* ***dijabetička neuropatija + BT-A*** *– skupina s dijabetičkom neuropatijom koja je u šapu primila BT-A u dozi 3, 5 ili 7 i.j./kg; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.*

Injiciranje otopine formalina u šapu štakora uzrokovalo je jači bolni odgovor (veći broj trzaja injicirane šape) u životinja s eksperimentalnim dijabetesom u odnosu na skupinu bez dijabetesa u drugoj fazi testa (15-60 min), ali razlika nije bila statistički značajna. Niti u prvoj fazi testa (prvih 15 minuta od injiciranja formalina) nije bilo statistički značajne razlike u broju bolnih odgovora između skupine s dijabetesom i one bez dijabetesa. Međutim, BT-A je u životinja s dijabetesom, nakon jednokratne s.c. primjene u šapu štakora, u dozama 5 i 7 i.j./kg, statistički značajno smanjio broj bolnih odgovora uzrokovanih formalinom u odnosu na skupinu s dijabetesom koja je u šapu primila fiziološku otopinu (Slika 15).

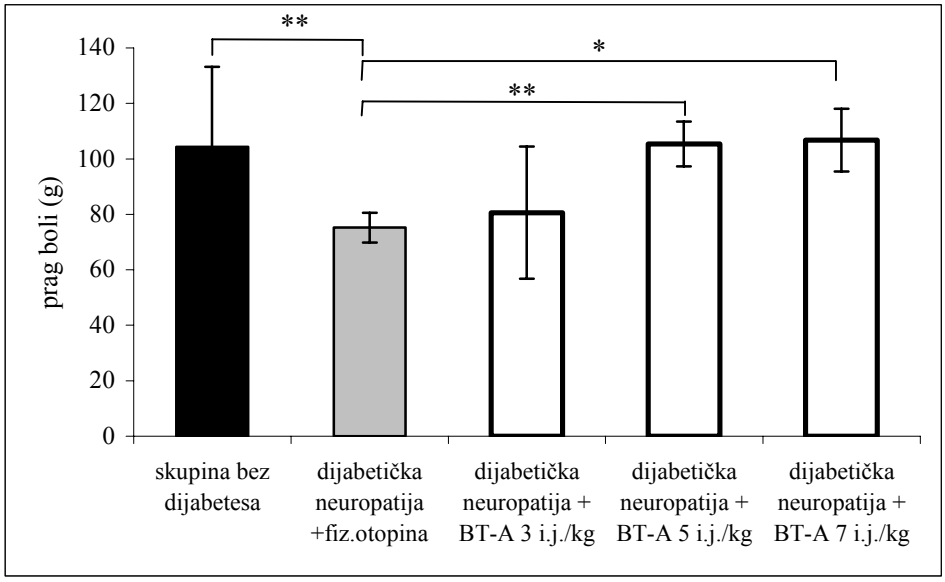
Najmanja primijenjena doza BT-A (3 i.j./kg) nije utjecala na mehaničku preosjetljivost niti na formalinom uzrokovanu bol u dijabetičnih životinja.



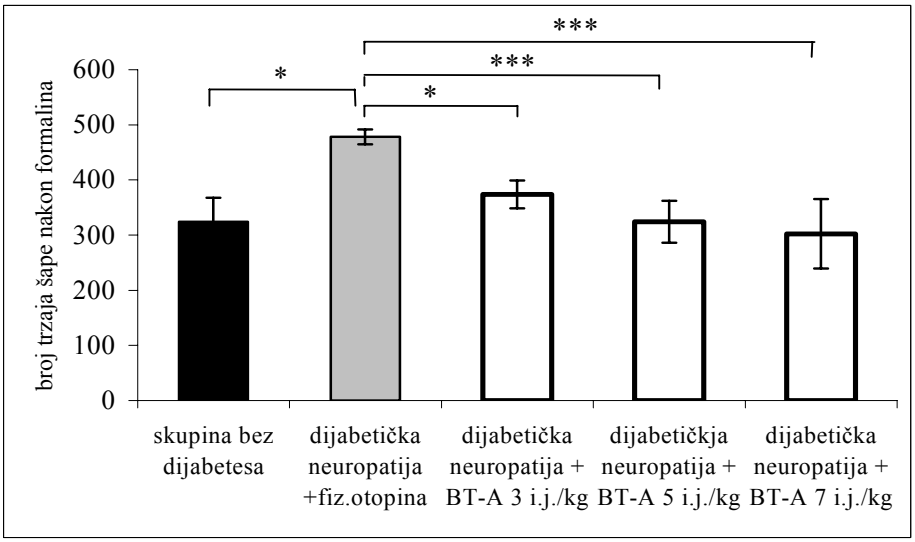
Slika 15. ***Utjecaj jednokratne primjene rastućih doza BT-A u plantarnu površinu šape štakora na broj trzaja šape injicirane formalinom u drugoj fazi testa u modelu dijabetičke neuropatije uzrokovane aloksanom.*** *Mjerenja su izvođena 10-12 dana nakon injiciranja BT-A ili fiziološke otopine u šapu štakora. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina±standardna devijacija, n=5-7;* ***skupina bez dijabetesa*** *– skupina koja nije injicirana aloksanom;* ***dijabetička neuropatija + fiz. otopina*** *- skupina s dijabetičkom neuropatijom koja je u šapu primila fiziološku otopinu;* ***dijabetička neuropatija + BT-A*** *– skupina s dijabetičkom neuropatijom koja je u šapu primila BT-A u dozi 3, 5 ili 7 i.j./kg; *p<0,05; **p<0,01.*

U streptozotocinskom modelu dijabetesa su 22 od 52 životinje s hiperglikemijom (koncentracija glukoze u krvi >15 mmol/L) nakon i.p. injiciranja otopine streptozotocina (80 mg/kg) razvile preosjetljivost na mehanički i kemijski podražaj (dijabetička neuropatija). Prag osjetljivosti na mehanički podražaj bio je statistički značajno niži (Slika 16), dok je broj trzaja formalinom-tretirane šape bio značajno veći (Slika 17) u tih životinja u odnosu na životinje bez dijabetesa (kontrolu). U ovom je modelu BT-A, nakon jednokratne periferne primjene u šapu štakora u dozama 5 i 7 i.j./kg, statistički značajno smanjio preosjetljivost na mehanički podražaj (Slika 16), a u dozama 3, 5 i 7 i.j./kg i povećanu kemijsku osjetljivost uzrokovanu formalinom (Slika 17).

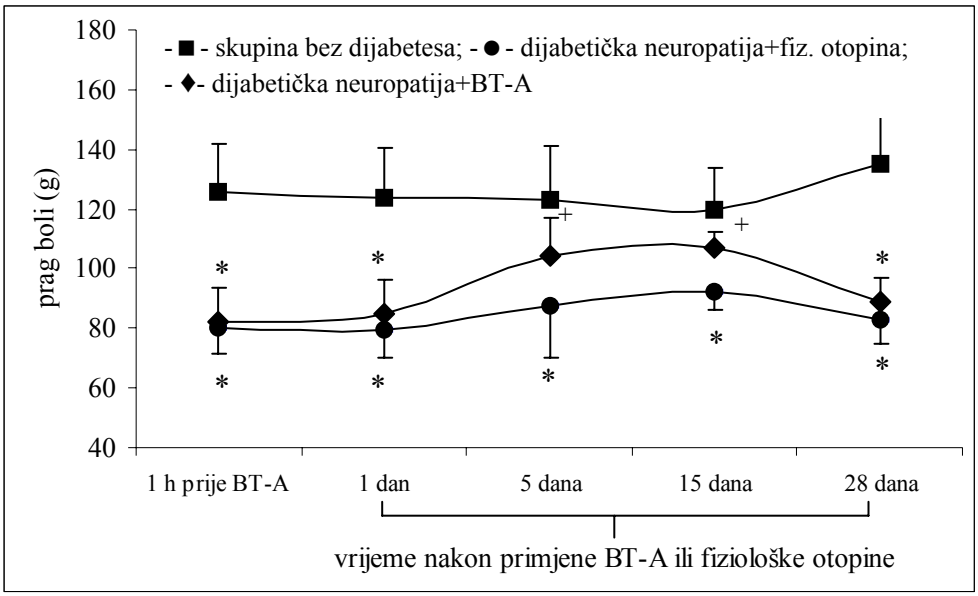
BT-A nije mijenjao povećanu osjetljivost na mehanički podražaj, kada je primijenjen 1 dan prije mjerenja. Statistički značajno smanjenje preosjetljivosti postignuto je 5 dana nakon s.c. injiciranja BT-A u šapu, a trajalo je barem 15 dana (Slika 18).



Slika 16. ***Utjecaj jednokratne primjene rastućih doza BT-A u šapu štakora na preosjetljivost na mehanički podražaj u modelu dijabetičke neuropatije uzrokovane streptozotocinom****. Prikazani su rezultati mjerenja 5 dana nakon injiciranja BT-A ili fiziološke otopine. Mjerena je sila kojom uteg pritišće površinu šape od oko 6 mm^2, a koja dovede do pomaka šape. Ta vrijednost predstavlja prag boli, a prikazana je kao masa u gramima. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina±standardna devijacija, n=5-6;* ***skupina bez dijabetesa*** *– skupina koja nije injicirana streptozotocinom;* ***dijabetička neuropatija + fiz. otopina*** *- skupina s neuropatijom koja je u šapu primila fiziološku otopinu;* ***dijabetička neuropatija + BT-A*** *– skupina s neuropatijom koja je u šapu primila BT-A (3, 5 ili 7 i.j./kg); *p<0,01; **p<0,001.*



Slika 17. ***Utjecaj jednokratne primjene rastućih doza BT-A u šapu štakora na broj trzaja šape injicirane formalinom (druga faza testa) u modelu dijabetičke neuropatije uzrokovane streptozotocinom****. Mjerenja su izvođena 10-12 dana nakon injiciranja BT-A ili fiziološke otopine. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina±standardna devijacija, n=5-6;* ***skupina bez dijabetesa*** *– skupina koja nije injicirana streptozotocinom;* ***dijabetička neuropatija + fiz. otopina*** *- skupina s neuropatijom koja je u šapu primila fiziološku otopinu;* ***dijabetička neuropatija + BT-A*** *– skupina s neuropatijom koja je u šapu primila BT-A (3, 5 ili 7 i.j./kg); *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.*



Slika 18. ***Utjecaj jednokratne primjene BT-A 5 i.j./kg u plantarnu površinu šape štakora na preosjetljivost na mehanički podražaj u modelu dijabetičke neuropatije uzrokovane streptozotocinom, mjereno prije primjene i 1, 5, 15 i 28 dana nakon primjene BT-A.*** *Mjerena je sila kojom uteg pritišće površinu šape od oko 6 mm^2, a koja dovede do pomaka šape, tj. bolnog odgovora. Ta vrijednost predstavlja prag boli, a radi jednostavnosti prikazana je kao masa u gramima. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina±standardna devijacija, n=5-7;* ***skupina bez dijabetesa (■)*** *–skupina kojoj nije injiciran streptozotocin;* ***dijabetička neuropatija + fiz. otopina (●)*** *- skupina s neuropatijom koja je u šapu primila fiziološku otopinu;* ***dijabetička neuropatija + BT-A (♦)*** *– skupina s neuropatijom koja je u šapu primila BT-A 5 i.j./kg; *p<0,001 u odnosu na skupinu bez dijabetesa; $^+$p<0,001 u odnosu na skupinu s dijabetičkom neuropatijom koja je u šapu primila fiziološku otopinu.*

4.2. Utjecaj botulinum toksina tipa A na upalu

Ispitivanje utjecaja BT-A, primijenjenog jednokratno s.c. u plantarnu površinu stražnje šape štakora, na lokalnu upalnu reakciju provodilo se nakon injiciranja karagenana, odnosno kapsaicina u istu šapu životinje. U pokusima su mjereni edem šapa, težina šapa i ekstravazacija proteina plazme u tkivu šapa pri upali.

4.2.1. Lokalna upala uzrokovana karagenanom

Injiciranje 1%-tne otopine karagenana u plantarnu površinu stražnje šape štakora uzrokovalo je lokalnu upalu karakteriziranu edemom i crvenilom injicirane šape. Tri sata nakon primjene karagenana mjeren je nastali edem kao promjena volumena tekućine u koju je uronjena šapa (izraženo u mililitrima), te kao povećanje mase šapa (izraženo u gramima) u odnosu na kontrolu koja je injicirana samo s fiziološkom otopinom (Tablica 12). BT-A, primijenjen periferno u plantarnu površinu šape štakora u dozi 5 i.j./kg 5 dana prije karagenana, nije utjecao na edem, tj. obujam (129) niti na masu šapa (Tablica 12).

Tablica 12. *Prikaz izmjerenih parametara (masa šapa, obujam šapa, ekstravazacija proteina) pri upali uzrokovanoj karagenanom.*

Tretman	Masa šapa (g)	Obujam šapa (mL)	Ekstravazacija proteina (apsorbancija/g tkiva)
Fiziološka otopina	1,82±0,13	0,2±0,05	0,450±0,13
1% karagenan	2,90±0,24**	0,66±0,12**	0,874±0,29*
1% karagenan + BT-A 5 i.j./kg	3,31±0,24**	0,58±0,07**	0,988±0,29*

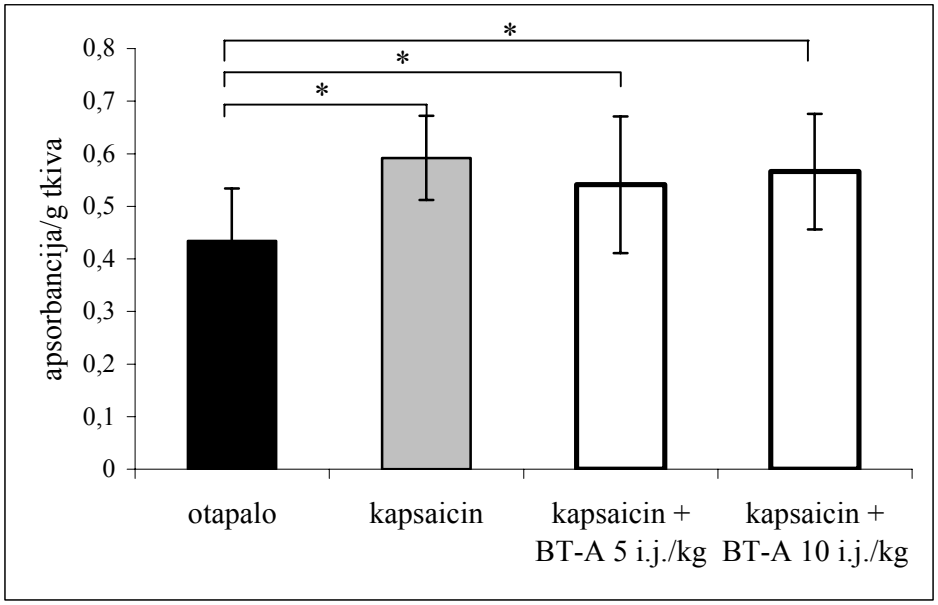
BT-A je primijenjen s.c. u šapu 5 dana prije karagenana. Mjerenja su izvođena 3 sata nakon uzrokovanja upale.
*Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina±standardna devijacija (n=6-7; *p<0,01, **p<0,001 u odnosu na skupinu injiciranu samo s fiziološkom otopinom).*

4.2.2. Ekstravazacija proteina uzrokovana karagenanom i kapsaicinom

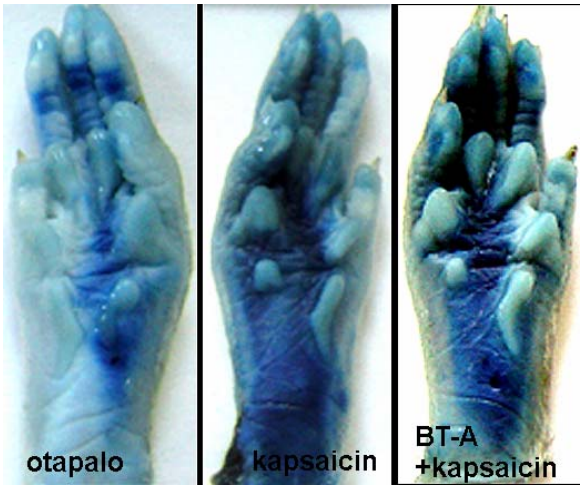
Periferno injiciranje otopine karagenana, osim edema, uzrokuje i crvenilo šape, te dovodi do ekstravazacije proteina iz krvnih žila uslijed njihove povećane propusnosti. Upala uzrokovana karagenanom je najjačeg intenziteta 3-6 sati nakon injiciranja. BT-A, primijenjen jednokratno s.c. u šapu štakora 5 dana prije karagenana u dozi 5 i.j./kg, nije utjecao na ekstravazaciju kompleksa Evansovo modrilo-proteini plazme. Izmjerene apsorbancije otopina formamida (izražene po gramu tkiva šape) u životinja kojima je injiciran BT-A nisu se značajnije razlikovale u odnosu na vrijednosti apsorbancija skupine tretirane samo s karagenanom (Tablica 12).

Periferno injiciranje 0,1 %-tne otopine kapsaicina u plantarnu površinu stražnje šape štakora uzrokuje crvenilo šape, te povećava ekstravazaciju proteina već15 minuta nakon injiciranja. Kapsaicin je, u odnosu na kontrolnu skupinu šapa injiciranih samo s otapalom (fiziološka otopina/10% etanol/10% Tween 80), povećao ekstravazaciju kompleksa Evansovo modrilo–proteini plazme za oko 36%, mjereno preko apsorbancija otopina formamida (prikazano po gramu tkiva) (Slika 19). Na fotografijama šapa se ekstravazacija kompleksa očituje kao intenzivna plava boja. Intenzitet plave boje je proporcionalan intenzitetu upale (Slika 20). BT-A u dozama 5 i 10 i.j./kg, primijenjen jednokratno periferno u šapu 5 dana prije kapsaicina, nije mijenjao učinke ove upalne tvari (Slika 19 i 20).

U oba modela je i samo injiciranje fiziološke otopine, odnosno otapala (fiziološka otopina/10% etanol/10% Tween 80) dovelo, u određenoj mjeri, do ekstravazacije kompleksa Evansovo modrilo–proteini plazme (Slika 19 i 20).



Slika 19. ***Utjecaj jednokratne primjene BT-A (5 i 10 i.j./kg) u šapu štakora na ekstravazaciju kompleksa Evansovo modrilo-proteini plazme u modelu upale uzrokovane kapsaicinom.*** *BT-A je primijenjen 5 dana prije kapsaicina. Ekstravazacija kompleksa mjerena je kao apsorbancija otopina formamida (prikazana po gramu tkiva šape). Za dodatni opis v. Materijali i metode. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina± standardna devijacija, n=6-8;* ***otapalo*** *- skupina koja je u šapu primila samo otapalo (fiziološka otopina/10% etanol/10% Tween 80);* ***kapsaicin*** *– skupina koja je u šapu primila 0,1% kapsaicin i fiziološku otopinu;* ***kapsaicin + BT-A*** *– skupina koja je u šapu primila 0,1% kapsaicin i BT-A (5 ili 10 i.j./kg); *p<0,05.*



Slika 20. ***Fotografije šapa tretiranih s otapalom (fiziološka/10% etanol/10 % Tween 80), 0,1% kapsaicinom, te s 0,1% kapsaicinom i BT-A (10 i.j./kg)****. BT-A je primijenjen u šapu štakora 5 dana prije kapsaicina. Šape su amputirane 15 minuta nakon injiciranja kapsaicina. Intenzitet plave boje je pokazatelj intenziteta ekstravazacije proteina, tj. upale uzrokovane kapsaicinom.*

4.3. Središnje mjesto antinociceptivnog djelovanja botulinum toksina tipa A

Kako bi ispitali našu hipotezu o središnjem mjestu antinociceptivnog djelovanja BT-A, napravili smo sljedeće pokuse:

1. BT-A smo primijenili intratekalno kako bi ispitali djelotvorne doze i nastup djelovanja;

2. spriječili smo mogućnost retrogradnog transporta toksina s periferije i provjerili njegovu djelotvornost na modelu upalne boli uzrokovane karagenanom, te

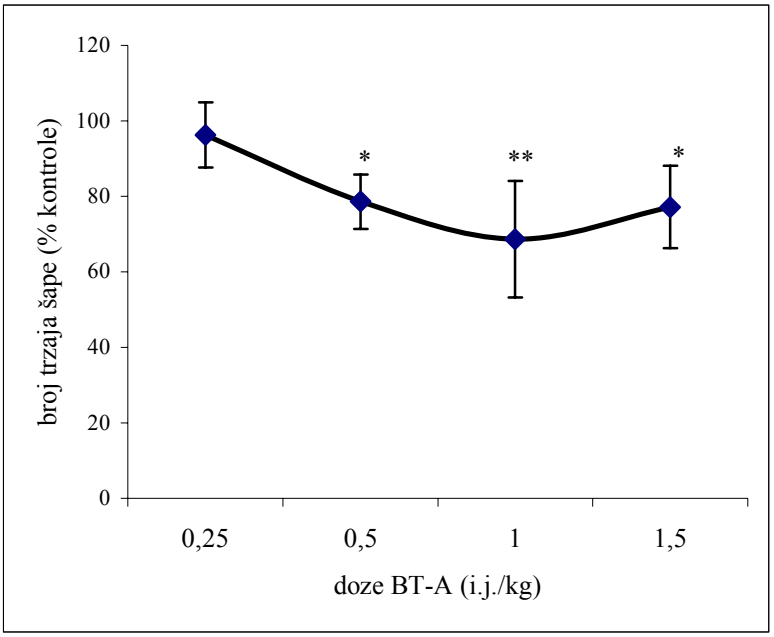
3. metodama imunohistokemije i Western blota pokušali smo detektirati BT-A ili njegove fragmente u tkivima *n. ishiadicusa* i senzornih ganglija životinja koje su 1, 3 ili 5 dana prije žrtvovanja periferno tretirane s BT-A u dozi 7 i.j./kg ili s fiziološkom otopinom (kontrola).

4.3.1. Antinociceptivno djelovanje botulinum toksina tipa A nakon intratekalne primjene

Učinak intratekalno primijenjenog BT-A ispitivan je na eksperimentalnim modelima upalne boli (formalinski test) i periferne neuropatske boli.

4.3.1.1. Formalinski test

Formalinskim testom se ispitivalo postoji li ovisnost učinka o dozi intratekalno primijenjenog BT-A, te koliko dugo antinociceptivno djelovanje traje. Rezultatima je pokazano da nakon intratekalne primjene BT-A djeluje već u dozi od 0,5 i.j./kg (7 puta manja doza od najmanje djelotvorne periferne) (Slika 21). BT-A je smanjio broj trzaja šape tretirane formalinom u odnosu na kontrolu, tj. životinje koje su primile fiziološku otopinu, samo u drugoj fazi formalinskog testa (15-60 minuta nakon injiciranja formalina), dok na bolne odgovore u prvih 15 minuta (prva faza), koji su posljedica izravne stimulacije nociceptora formalinom, nije utjecao. Antinociceptivno djelovanje BT-A zabilježeno je 24 sata nakon intratekalne primjene. U ovom pokusu nije primjećeno povećanje učinka primjenom doza većih od 0,5 i.j./kg, tj. nije bilo razlike u intenzitetu antinociceptivnog djelovanja (Slika 21).



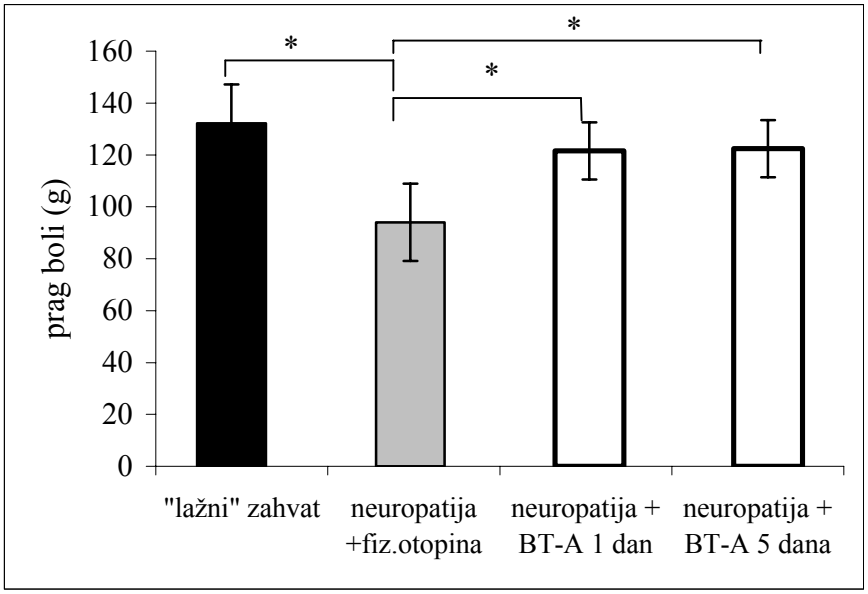
Slika 21. ***Utjecaj rastućih doza intratekalno primijenjenog BT-A na bolne odgovore u drugoj fazi formalinskog testa.*** *Mjerenja su izvođena 24 sata nakon primjene BT-A. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina postotka smanjenja broja trzaja šapa injiciranih formalinom u odnosu na kontrolu±standardna devijacija, n=5-6; *p<0,05; **p<0,01 u usporedbi s kontrolom kojoj je intratekalno injicirana fiziološka otopina; vrijednost kontrole: 328±32 trzaja šape injicirane formalinom u drugoj fazi testa.*

4.3.1.2. Periferna neuropatija

Dvanaest od dvadeset životinja kojima je parcijalno prerezan *n. ishiadicus* razvile su preosjetljivost na mehanički podražaj 2 tjedna nakon kirurškog zahvata, te je smatrano da su razvile neuropatiju. Prag osjetljivosti, mjeren metodom pritiska šape, bio je značajno niži u odnosu na vrijednost izmjerenu u životinja kojima je učinjen „lažni“ zahvat (kontrola). U ovom pokusu nisu primijećene promjene u osjetljivosti na termalni podražaj mjeren metodom vruće ploče.

Nakon jednokratne intratekalne primjene u dozi od 1 i.j./kg, BT-A je značajno smanjio preosjetljivost na mehanički podražaj u odnosu na skupinu životinja s neuropatijom kojima je intratekalno injicirana fiziološka otopina (Slika 22).

Antinociceptivno djelovanje zabilježeno je već 24 sata nakon intratekalne primjene BT-A, a potvrđeno je i 5 dana nakon injiciranja.

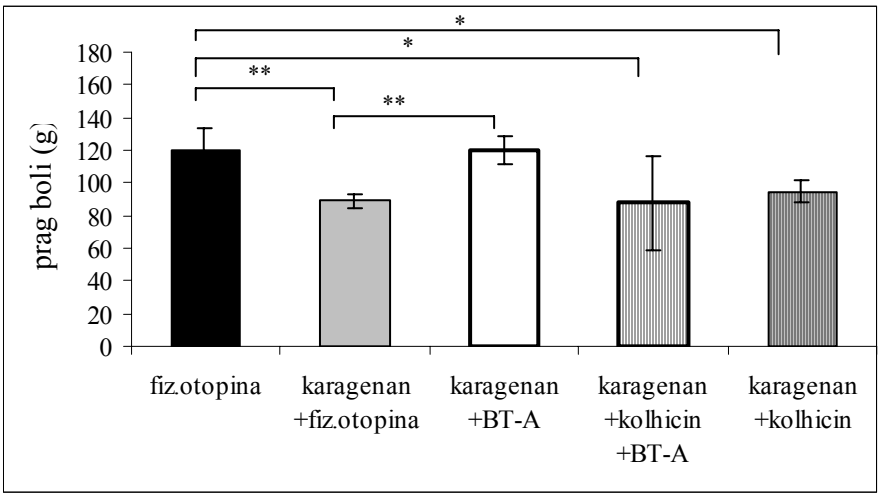


Slika 22. ***Utjecaj intratekalno primijenjenog BT-A (1 i.j./kg) na preosjetljivost na mehanički podražaj u modelu periferne neuropatije, mjereno 1 dan i 5 dana nakon primjene****. Mjerena je sila kojom uteg pritišće površinu šape od oko 6 mm^2, a koja dovede do pomaka šape, tj. bolnog odgovora. Ta vrijednost predstavlja prag boli, a radi jednostavnosti prikazana je kao masa u gramima. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina±standardna devijacija, n=6;* ***„lažni" zahvat*** *– skupina bez zarezanog živca;* ***neuropatija + fiz. otopina*** *– skupina s neuropatijom koja je intratekalno primila fiziološku otopinu;* ***neuropatija + BT-A 1 dan*** *– skupina s neuropatijom koja je intratekalno primila BT-A (mjerenje 1 dan nakon injiciranja BT-A);* ***neuropatija + BT-A 5 dana*** *– skupina s neuropatijom kojoj je intratekalno primijenjen BT-A (mjerenje 5 dana nakon injiciranja BT-A); *p<0,01; **p<0,001.*

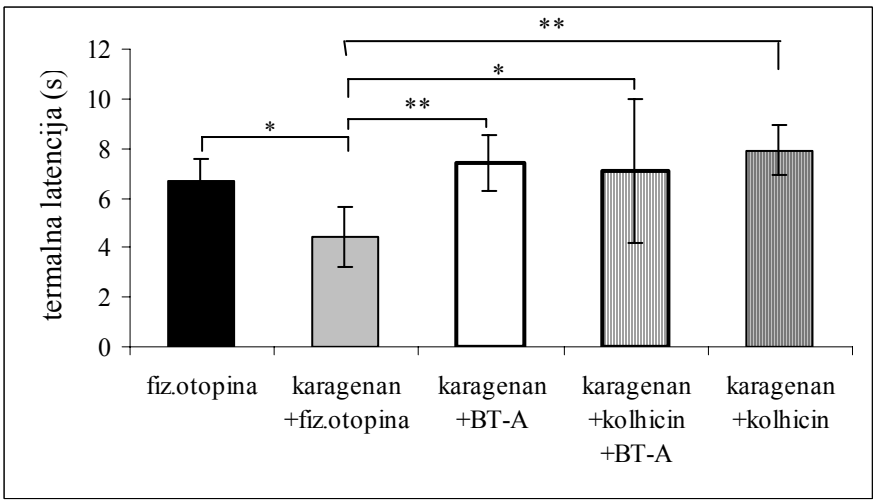
4.3.2. Djelovanje botulinum toksina tipa A nakon blokade aksonalnog transporta kolhicinom

BT-A, primijenjen jednokratno periferno u dozi 5 i.j./kg 5 dana prije injiciranja otopine karagenana u šapu štakora, smanjio je karagenanom uzrokovanu povećanu osjetljivost na termalni i mehanički podražaj. Međutim, kada je kolhicin (5 mM) primijenjen u *n. ishiadicus* 1 dan prije s.c. injiciranja BT-A u šapu štakora, BT-A nije djelovao, tj. nije mijenjao karagenanom uzrokovanu preosjetljivost na mehanički podražaj (Slika 23). Kolhicin je spriječio djelovanje BT-A.

Sam kolhicin nije utjecao na karagenanom uzrokovanu preosjetljivost na mehanički podražaj međutim, značajno je smanjio preosjetljivost na termalni podražaj u istom modelu (Slika 24).



Slika 23. ***Utjecaj kolhicina na djelovanje periferno primijenjenog BT-A (5 i.j./kg) u šapu štakora u modelu karagenanom uzrokovane preosjetljivosti na mehanički podražaj.*** *Mjerenja su izvođena 5 dana nakon primjene BT-A (za detaljan protokol v. Materijali i metode). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina±standardna devijacija, n=4-6;* ***fiz. otopina*** *– skupina kojoj je u živac i šapu injicirana fiziološka otopina;* ***karagenan*** *– skupina kojoj je u živac injicirana fiziološka otopina, a u šapu 1% karagenan i fiziološka otopina;* ***karagenan + BT-A*** *– skupina kojoj je u živac injicirana fiziološka otopina, a u šapu BT-A i 1% karagenan;* ***karagenan + kolhicin + BT-A*** *– skupina kojoj je u živac injiciran 5 mM kolhicin, a u šapu BT-A i 1% karagenan;* ***karagenan + kolhicin*** *– skupina kojoj je u živac injiciran 5 mM kolhicin, a u šapu fiziološka otopina i 1% karagenan;*p<0,05; **p<0,01.*



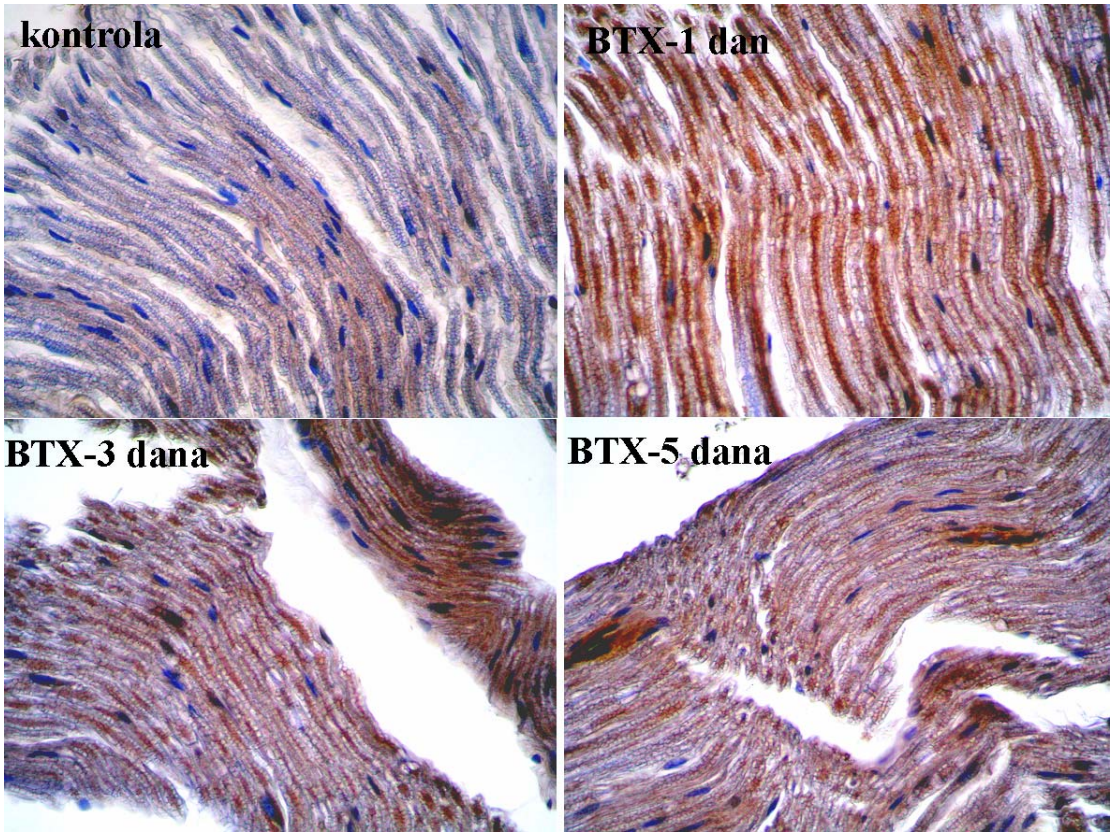
Slika 24. ***Utjecaj kolhicina na djelovanje periferno primijenjenog BT-A (5 i.j./kg) u šapu štakora u modelu karagenanom uzrokovane preosjetljivosti na termalni podražaj.*** *Mjerenja su izvođena 5 dana nakon primjene BT-A (za protokol v. Materijali i metode). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina±standardna devijacija, n=4-6;* ***fiz. otopina*** *– skupina kojoj je u živac i šapu injicirana fiziološka otopina;* ***karagenan*** *– skupina kojoj je u živac injicirana fiziološka otopina, a u šapu 1% karagenan i fiziološka otopina;* ***karagenan + BT-A*** *– skupina kojoj je u živac injicirana fiziološka otopina, a u šapu 1% karagenan i BT-A;* ***karagenan + kolhicin + BT-A*** *– skupina kojoj je u živac injiciran 5 mM kolhicin, a u šapu 1% karagenan i BT- A;* ***karagenan + kolhicin*** *– skupina kojoj je u živac injiciran 5 mM kolhicin, a u šapu 1% karagenan i fiziološka otopina; *p<0,05; **p<0,01.*

4.3.3. Imunohistokemija

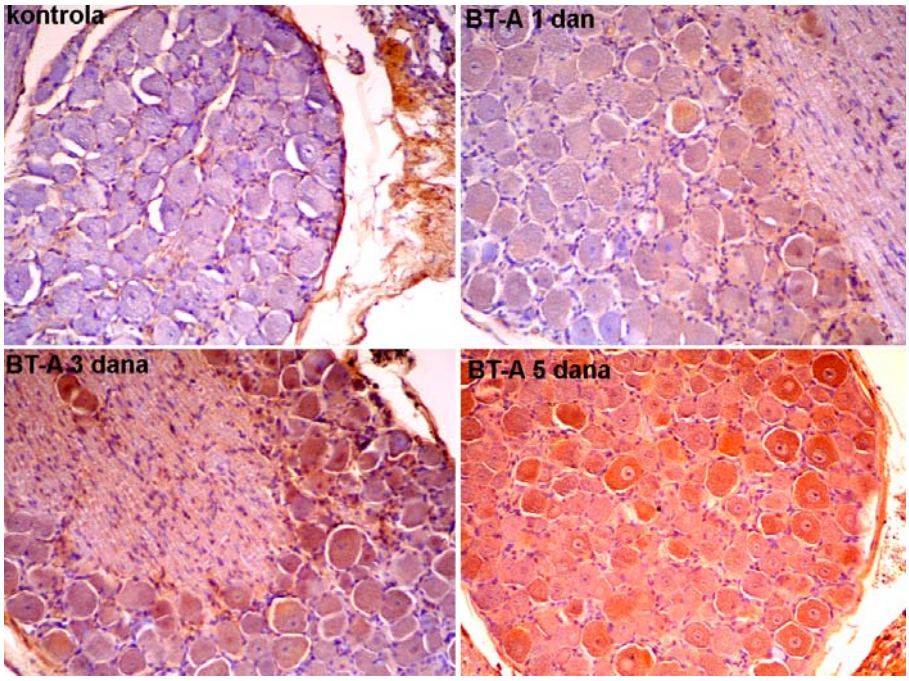
Imunohistokemijsko bojanje tkiva senzornih ganglija DAB-om (na slikama se vidi kao smeđe obojenje) ukazalo je na moguće postojanje razlike između *n. ishiadicusa* i senzornih ganglija kontrolnih štakora, te tkiva štakora tretiranih s BT-A (Slika 25, 26, 27).

Slike 25, 26 i 27 pokazuju imunorekativnost na BT-A (smeđa do crveno smeđa boja u odnosu na ljubičastu ili plavu boju u kontrole) u *n. ishiadicusu* i senzornim ganglijima životinja tretiranih u plantarnu površinu šape s BT-A u dozi 7 i.j./kg 1, 3 i 5 dana prije žrtvovanja i uzimanja uzoraka. Jasna imunoreaktivnost u *n. ishiadicusu* nađena je već 1 dan nakon injiciranja BT-A (Slika 25), dok je najjači intenzitet BT-A imunorekativnosti u stanicama senzornih ganglija primijećen petog dana nakon injiciranja BT-A (Slike 26 i 27). To se vremenski podudara s nastupom antinociceptivnog djelovanja periferno primijenjenog BT-A u eksperimentalnim modelima boli.

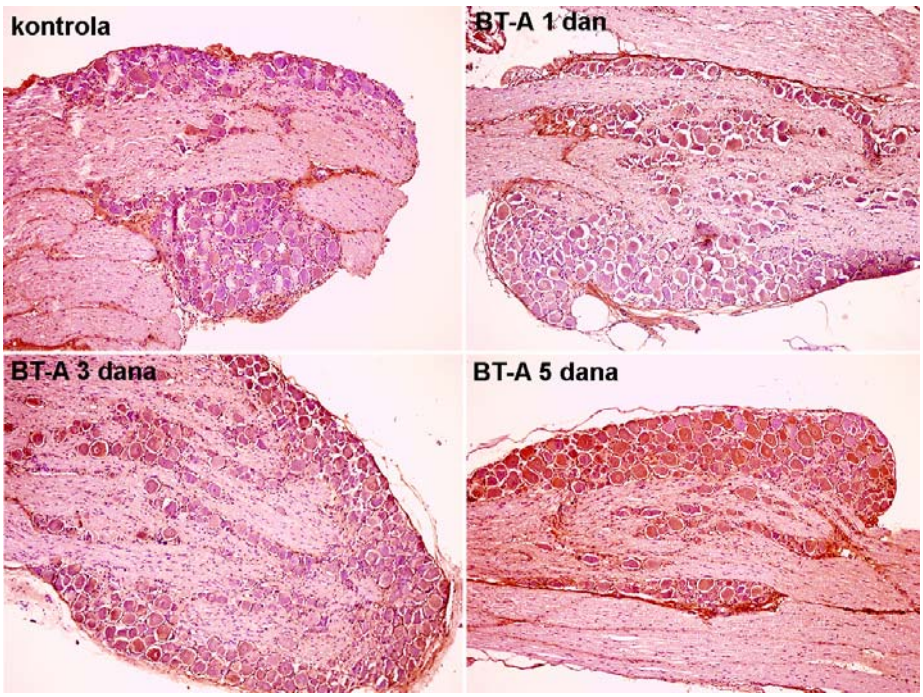
U pojedinim pokusima došlo je do bojanja neurona i u kontrolnim uzorcima (uzetih od životinja koje nisu dobile BT-A) međutim, niti u jednom pokusu nismo našli da bi se obojili samo kontrolni uzorci. Osim toga, sa svakim je od tri korištena antitijela bilo pokusa u kojima su bili obojani samo aksoni i tijela neurona životinja tretiranih s BT-A ili je obojanost bila jače izražena.



Slika 25. *Imunohistokemijsko bojanje n. ishiadicusa kontrolne životinje te životinja tretiranih s BT-A (7 i.j./kg) 1, 3 i 5 dana prije uzimanja uzoraka. (Polyclonal Anti-Clostridium botulinum neurotoxin complex - Acris, Njemačka; razrjeđenje: 1:20). Povećanje 40x.*



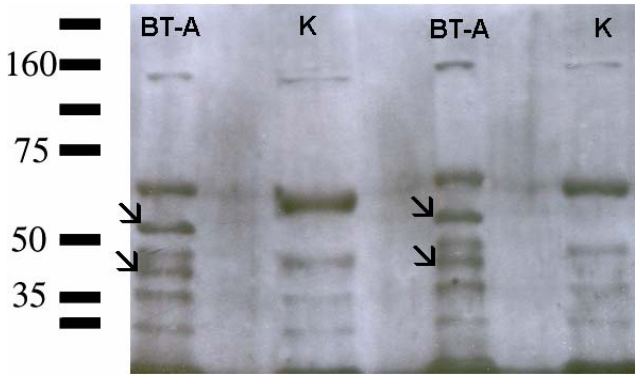
Slika 26. *Imunohistokemijsko bojanje stanica senzornih ganglija kontrolne životinje i životinja tretiranih s BT-A (7 i.j./kg) 1, 3 i 5 dana prije uzimanja uzoraka. (Polyclonal Anti-Clostridium botulinum neurotoxin complex - Acris, Njemačka, razrjeđenje: 1:20). Povećanje 20 x.*



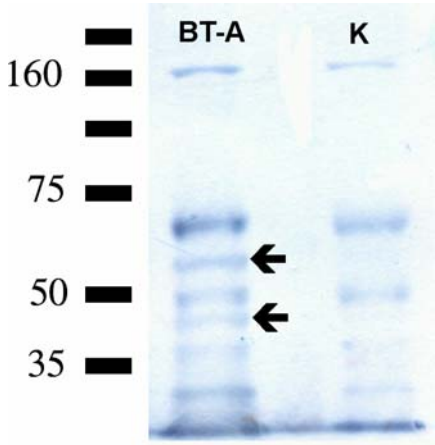
Slika 27. *Imunohistokemijsko bojanje stanica senzornih ganglija kontrolne životinje i životinja tretiranih s BT-A (7 i.j./kg) 1, 3 i 5 dana prije uzimanja uzoraka. (Polyclonal Anti-Clostridium botulinum light chain -Biodesign, SAD, razrjeđenje: 1:50). Povećanje 20 x.*

4.3.4. Western blot metoda

Slike dobivene Western blot metodom imunodetekcije proteina iz homogenata tkiva *n. ishiadicusa* kontrolne životinje (koja nije bila tretirana s BT-A) i životinje koja je 1 dan prije žrtvovanja i uzimanja živca injicirana periferno s BT-A u dozi 7 i.j./kg pokazuju određene razlike između kontrolnog i tretiranog uzorka, koje su na slikama označene strelicama (Slike 28 i 29). Uzorci tretirani s BT-A imaju vrpcu (liniju, *engl.* band) na oko 50 kDa (obično nešto više) koji nije bio prisutan u kontrole, ali su označene i linije koje ne odgovaraju kratkom lancu BT-A, te možda predstavljaju imunorektivne produkte razgradnje velike molekule BT-A (linija ispod 50 kDa na slikama 28 i 29). Međutim, i u ovim je pokusima došlo do nespecifičnog označavanja proteinskih vrpci i u kontrolnim uzorcima (moguće zbog grešaka pri radu – u protokolu, a vjerojatno i zbog nespecifičnosti primarnog poliklonskog antitijela koje nije prije rabljeno u ove svrhe).



Slika 28. *Homogenat tkiva n. ishiadicusa kontrolne životinje (K) i životinje tretirane s BT-A (7 i.j./kg) prikazan metodom Western blot. Korišteno antitijelo: Polyclonal Anti-Clostridium botulinum neurotoxin complex - Acris, Njemačka, razrjeđenje 1:500.*



Slika 29. *Homogenat tkiva n. ishiadicusa kontrolne životinje (K) i životinje tretirane s BT-A (7 i.j./kg) prikazan metodom Western blot. Korišteno antitijelo: Polyclonal Anti-Clostridium botulinum neurotoxin complex - Acris, Njemačka, razrjeđenje 1:1000.*

Zbog nedovoljne reproducibilnosti ovih nalaza, smatramo da su rezultati samo obećavajući te da ukazuju na moguću prisutnost BT-A imunoreaktivnosti u aksonima osjetnih neurona. Međutim, dok ne bude moguće nabaviti specifičnija protutijela, ove rezultate ne smatramo završenima.

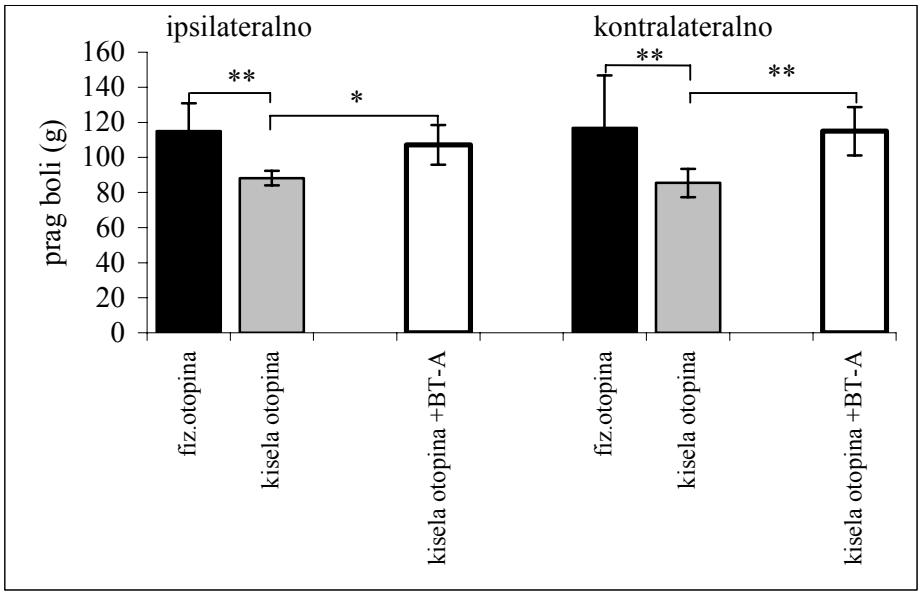
4.4. Djelovanje botulinum toksina tipa A na sekundarnu mehaničku hiperalgeziju

Kako bi provjerili hipotezu disertacije o mogućoj interferenciji BT-A s procesima središnje senzitizacije, koristili smo eksperimentalni model kronične mišićne hiperalgezije koji je karakteriziran bilateralnom sekundarnom mehaničkom hiperalgezijom.

4.4.1. Utjecaj botulinum toksina tipa A na kroničnu mišićnu hiperalgeziju

4.4.1.1. Periferna primjena botulinum toksina tipa A

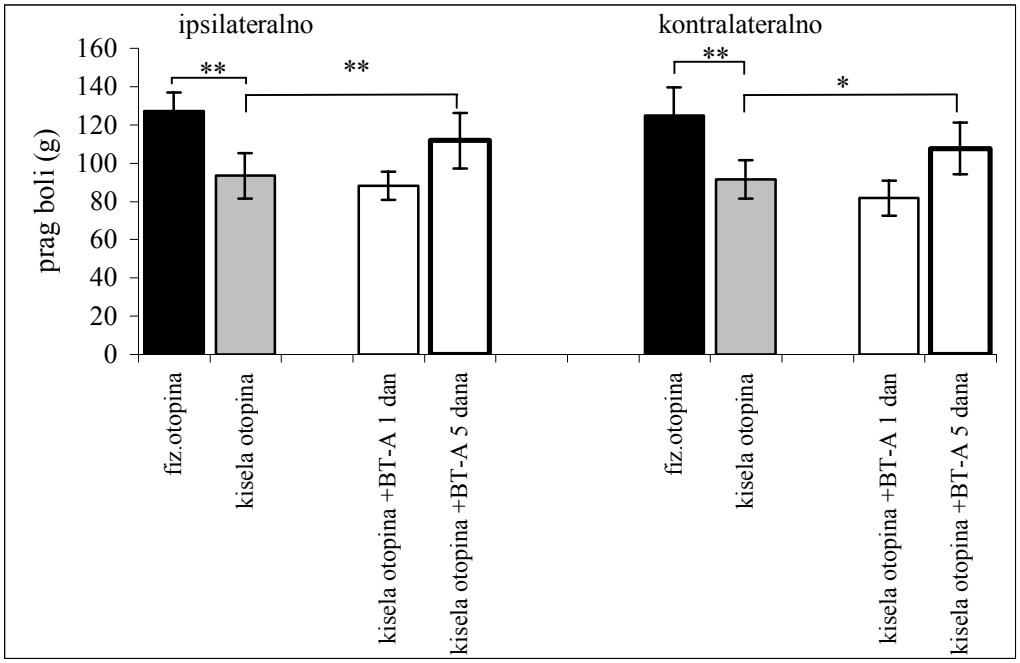
Dvostruko injiciranje kisele otopine 0,9% NaCl pH 4,0 u desni *gastrocnemius* mišić štakora uzrokovalo je povećanu osjetljivost na mehanički podražaj, mjerenu na tkivu šape (sekundarna hiperalgezija). Preosjetljivost je izmjerena na strani injiciranja, ali i na kontralateralnoj strani. Prag mehaničkog podražaja, mjeren metodom pritiska šape, bio je obostrano značajno niži u odnosu na kontrolnu skupinu koja je injicirana i.m. s fiziološkom otopinom. BT-A u dozi 5 i.j./kg, primijenjen s.c. u plantarnu površinu šape 5 dana prije injiciranja kisele otopine u mišić, spriječio je nastanak mehaničke hiperalgezije na strani injiciranja,ali i na kontralateralnoj strani (Slika 30).



Slika 30. ***Utjecaj jednokratne primjene BT-A (5 i.j./kg) u plantarnu površinu šape štakora na nastanak preosjetljivosti na mehanički podražaj u modelu kronične mišićne hiperalgezije na ipsilateralnoj i kontralateralnoj strani.*** *BT-A je primijenjen 5 dana prije i.m. injiciranja kisele fiziološke otopine 0,9% NaCl-a pH 4,0 (za dodatni opis v. Materijali i metode). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina±standardna devijacija, n=6;* ***fiz. otopina*** *– skupina i.m. i s.c. (u šapu) injicirana s fiziološkom otopinom;* ***kisela otopina*** *– skupina i.m. injicirana s kiselom otopinom 0,9% NaCl-a pH 4,0, a s.c. s fiziološkom otopinom;* ***kisela otopina + BT-A*** *– skupina i.m. injicirana s kiselom otopinom, a s.c. s BT-A; *p<0,05; **p<0,001.*

U drugoj seriji pokusa BT-A je u dozi 5 i.j./kg injiciran u šapu štakora 24 sata nakon druge injekcije kisele otopine 0,9% NaCl-a pH 4,0 u mišić, i to nakon nastale hiperalgezije. BT-

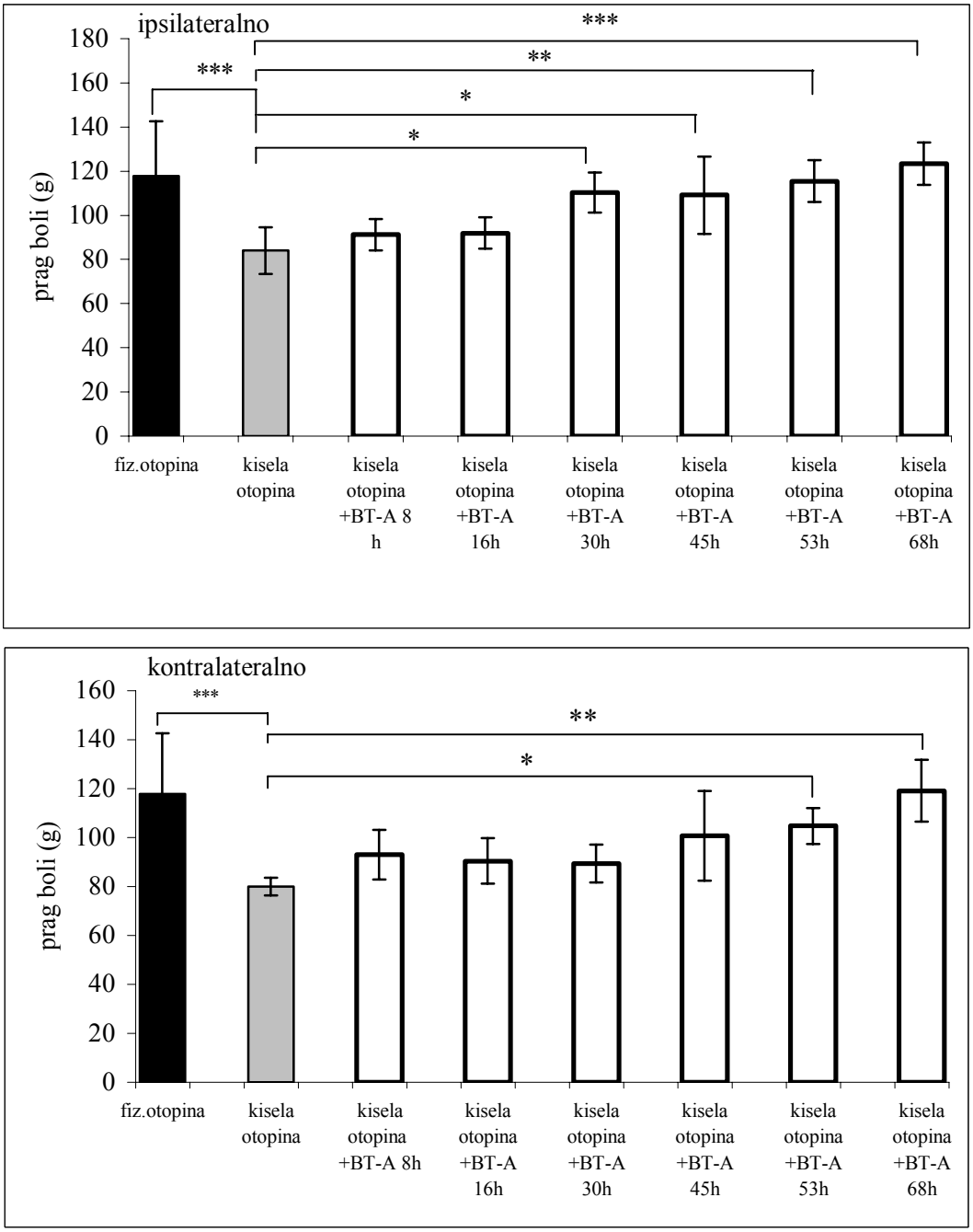
A je smanjio preosjetljivost na mehanički podražaj obostrano (na strani primjene i na suprotnoj strani) u odnosu na skupinu koja je u šapu injicirana s fiziološkom otopinom. BT-A je nije djelovao 1 dan, već tek 5 dana nakon primjene (Slika 31).



Slika 31. ***Utjecaj jednokratne primjene BT-A (5 i.j./kg) u šapu štakora na preosjetljivost na mehanički podražaj u modelu kronične mišićne hiperalgezije na ipsilateralnoj i kontralateralnoj strani****. Mjerenja su izvođena 1 i 5 dana nakon primjene BT-A (za dodatni opis v. Materijali i metode). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina±standardna devijacija, n=6;* ***fiz. otopina*** *– skupina i.m. i u šapu injicirana s fiziološkom otopinom;* ***kisela otopina*** *– skupina i.m. injicirana s kiselom otopinom 0,9% NaCl-a pH 4,0, a u šapu s fiziološkom otopinom;* ***BT-A 1 dan + kisela otopina*** *– skupina i.m. injicirana s kiselom otopinom, a u šapu s BT-A (mjerenje 1 dan nakon primjene BT-A);* ***BT-A 5 dana + kisela otopina*** *– skupina i.m. injicirana s kiselom otopinom, a u šapu s BT-A (mjerenje 5 dana nakon primjene BT-A); *p<0,05; **p<0,001.*

4.4.1.2. Primjena botulinum toksina tipa A u *n. ishiadicus*

Primijenjen u dozi od 0,5 i.j./kg u *n. ishiadicus* 24 h nakon druge i.m. injekcije kisele otopine 0,9%NaCl-a pH 4,0 i nakon nastale hiperalgezije, BT-A je smanjio preosjetljivost na mehanički odražaj bilateralno, ali s vremenskom razlikom. Na ipsilateralnoj je strani učinak bio značajan već nakon 30 sati, dok je kontralateralno značajno smanjenje preosjetljivosti zabilježeno tek 53 sata nakon primjene BT-A (Slika 32).



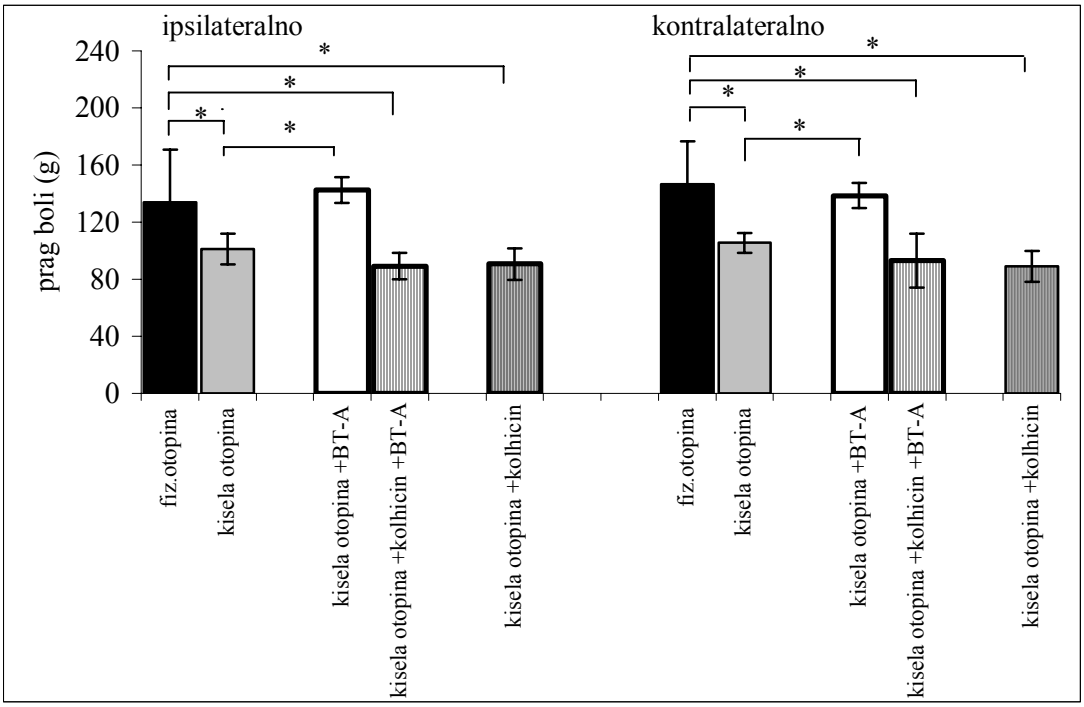
Slika 32. ***Utjecaj BT-A (0,5 i.j./kg), primijenjenog u n. ishiadicus, na ipsilateralnu i kontralateralnu preosjetljivost na mehanički podražaj u modelu kronične mišićne hiperalgezije.*** *Mjerenja su izvođena 8, 16, 30, 45, 53 i 68 sati nakon injiciranja BT-A (za dodatni opis v. Materijali i metode). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina±standardna devijacija, n=7;* ***fiz. otopina*** *– skupina i.m.i u živac injicirana s fiziološkom otopinom;* ***kisela otopina*** *- skupina i.m. injicirana s kiselom otopinom 0,9% NaCl-a pH 4,0, a u živac s fiziološkom otopinom;* ***kisela otopina + BT-A*** *broj sati - skupina koja je i.m. injicirana s kiselom otopinom, u živac je injiciran BT-A, a mjerenja su izvođena 8, 16, 30, 45, 53 ili 63 sata nakon injiciranja BT-A;*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.*

4.4.2. Utjecaj botulinum toksina tipa A na hiperalgeziju na kontralateralnoj strani nakon inhibicije aksonalnog transporta

4.4.2.1. Inhibicija aksonalnog transporta botulinum toksina tipa A kolhicinom

Dvostruko injiciranje kisele otopine 0,9% NaCl-a u mišić životinja uzrokovalo je obostrano povećanu osjetljivost na mehanički podražaj tkiva šape. BT-A je, nakon primjene u plantarnu površinu šape u dozi 5 i.j./kg 5 dana prije mjerenja, a 48 sata nakon druge i.m. injekcije kisele otopine, smanjio preosjetljivost na obje strane u odnosu na skupinu koja je u šapu primila fiziološku otopinu. Kolhicin je, primijenjen u *n. ishiadicus* 24 sata nakon druge i.m. injekcije kisele otopine, a 24 sata prije injiciranja BT-A u šapu, spriječio djelovanje BT-A na ipsilateralnu i kontralateralnu preosjetljivost na mehanički podražaj (Slika 33).

Sam kolhicin nije mijenjao povećanu osjetljivost na mehanički podražaj niti na jednoj strani (Slika 33).

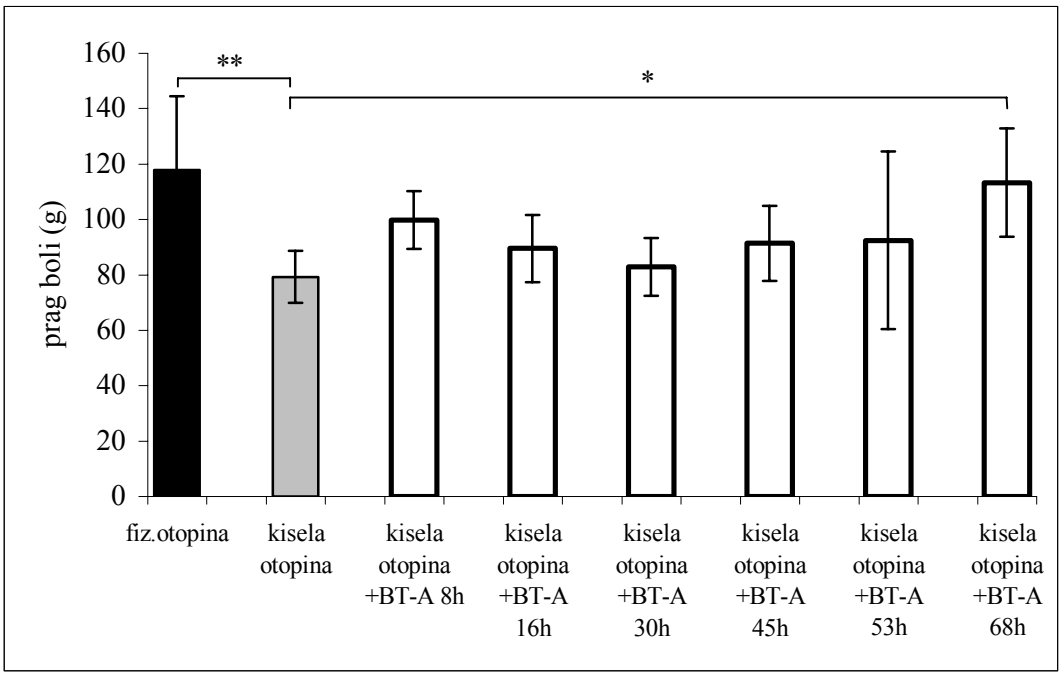


Slika 33. ***Utjecaj kolhicina na djelovanje periferno primijenjenog BT-A (5 i.j./kg) u šapu štakora u modelu kronične mišićne hiperalgezije****. Mjerena je preosjetljivost na mehanički podražaj 5 dana nakon periferne primjene BT-A (za dodatni opis v. Materijali i metode). Kisela otopina, kolhicin i BT-A su u svim pokusima injicirani na desnu stranu (ipsilateralno), a mjerenja su vršena obostrano. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina±standardna devijacija; n=-6;* ***fiz. otopina*** *– skupina injicirana i.m., u živac i u šapu samo s fiziološkom otopinom****; kisela otopina –*** *skupina i.m. injicirana s kiselom otopinom 0,9% NaCl-a pH 4,0, a u šapu i živac s fiziološkom otopinom;* ***kisela otopina + BT-A*** *– skupina i.m. injicirana s kiselom otopinom 0,9% NaCl-a, u živac s fiziološkom otopinom, a u šapu s BT-A;* ***kisela otopina*** *+* ***kolhicin + BT-A*** *– skupina injicirana i.m. s kiselom otopinom, s 5 mM kolhicinom u živac, a u šapu s BT-A;* ***kisela otopina*** *+* ***kolhicin*** *– skupina injicirana i.m. s kiselom otopinom, s 5 mM kolhicinom u živac, a u šapu s fiziološkom otopinom; *p<0,001.*

4.4.2.2. Inhibicija aksonalnog transporta botulinum toksina tipa A transekcijom *n. ishiadicusa*

Nakon injiciranja BT-A u dozi 0,5 i.j./kg u desni *n. ishiadicus* životinjama s bilateralnom mehaničkom hiperalgezijom uzrokovanom dvostrukim i.m. injiciranjem kisele otopine 0,9% NaCl-a pH 4,0, živac je prerezan ispod mjesta injiciranja kako bi se spriječila mogućnost njegova anterogradnog transporta i isključilo periferno mjesto djelovanja. Ispitivalo se djeluje li BT-A na kontralateralnu preosjetljivost i kada učinak nastupa.

Transekcija živca nije spriječila djelovanje BT-A na kontralateralnu mehaničku hiperalgeziju. BT-A je smanjio preosjetljivost na mehanički podražaj na kontralateralnoj strani u odnosu na životinje kojima je u živac, prije transekcije, injicirana fiziološka otopina. Djelovanje BTA zabilježeno je 68 h nakon njegova intraneuronalnog injiciranja (Slika 34).



Slika 34. ***Utjecaj distalne transekcije n. ishiadicusa na djelovanje intraneuronalno primijenjenog BT-A (0,5 i.j./kg) u modelu kronične mišićne hiperalgezije.*** *Mjerena je kontralateralna preosjetljivost na mehanički podražaj, i to 8, 16, 30, 45, 53 i 68 sati nakon injiciranja BT-A u živac (za dodatni opis v. Materijali i metode). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina±standardnadevijacija., n=8;* ***fiz. otopina*** *– skupina i.m. i u živac injicirana s fiziološkom otopinom;* ***kisela otopina*** *– skupina i.m. injicirana s kiselom otopinom 0,9% NaCl-a pH 4,0, a intraneuronalno s fiziološkom otopinom uz transekciju živca;* ***kisela otopina + BT-A*** *broj sati - skupina i.m. injicirana s kiselom otopinom, intraneuronalno s BT-A uz transekciju živca, a mjerenja su izvođena 8, 16, 30, 45, 53 i 60 sati nakon injiciranja BT-A; *p<0,01; **p<0,001.*

5. RASPRAVA

5.1. Utjecaj botulinum toksina tipa A na različite vrsti boli

Ako se bol, s obzirom na patofiziologiju, podijeli na tri vrste (49)

- nociceptivnu,
- upalnu i
- neuropatsku,

tada rezultati ove disertacije pokazuju da BT-A ne utječe na nociceptivnu bol, dok na druge dvije vrste boli djeluje.

5.1.1. Nociceptivna bol

Ispitivanja djelovanja BT-A na nociceptivnu bol u ovoj disertaciji pokazala su da toksin ne mijenja prag podražaja nakon akutne termalne, odnosno mehaničke aktivacije nociceptora. Niti u prvoj fazi formalinskog testa, za koju se smatra da je posljedica izravnog podražaja nociceptora formalinom, BT-A nije utjecao na bolne odgovore. Ovi su rezultati u skladu s eksperimentalnim podacima, dobivenim u laboratorijima Allergana, koji su pokazali da BT-A, neovisno od primijenjene doze, ne utječe na prvu fazu formalinskog testa, niti na akutnu termalnu nocicepciju (87).

Dva klinička ispitivanja utjecaja BT-A na akutnu nocicepciju su također pokazala da toksin ne utječe na nociceptivnu bol. U jednom ispitivanju BT-A (100 i.j.), primijenjen s.c. u podlakticu zdravim dobrovoljcima, nije mijenjao termalni prag podražaja 4, odnosno 8 tjedana nakon primjene (131*)*. Drugo je ispitivanje na zdravim dobrovoljcima, nakon intradermalnog injiciranja BT-A (5-20 i.j.) u podlakticu, pokazalo da nakon akutne transkutane električne i mehaničke stimulacije, BT-A, neovisno o dozi, ne mijenja intenzitet uzrokovane boli (132).

Činjenica da BT-A ne djeluje na akutnu nociceptivnu bol, tj. da ne mijenja normalni osjet boli, objašnjava zašto antinociceptivni učinak BT-A nije uočen ranije u brojnim opisima botulizma. Jednostavno, bolesnici su normalno osjećali bol, a moguća činjenica da je nekome bila ublažena upalna ili neuropatska bol mogla je biti i zanemarena u svjetlu opasnih posljedica trovanja s botulinum toksinom

Međutim, nedostatak učinka BT-A na normalnu nociceptivnu bol predstavlja i ogroman izazov o stvarnom djelovanju ovog toksina na senzorne neurone.

Izostanak djelovanja na akutnu nocicepciju objašnjen je time da na periferiji BT-A ne utječe na nastanak, niti na provodljivost akcijskog potencijala (88). Međutim, nedavnim je ispitivanjem lučenja ekscitacijskih aminokiselina na periferiji pokazano da termalni podražaji nociceptora, tj. TRPV1 receptora, dovode i do perifernog lučenja glutamata iz okončina senzornih neurona (42). Izlučeni glutamat djeluje autokrino, preko NMDA, AMPA i kainatnih receptora, pojačavajući nocicepciju,. Sukladno predloženoj perifernoj inhibiciji lučenja neurotransmitora bilo bi za očekivati da BT-A inhibira lučenje glutamata, te da posljedično smanjuje akutnu termalnu nocicepciju.

S druge strane, niti naša hipoteza o središnjem djelovanju BT-A ne objašnjava izostanak učinka toksina na ovu vrstu boli. Naime, ako BT-A dolazi u središnje strukture, te iz središnjih ogranaka senzornih neurona inhibira lučenje neurotransmitora na isti način kao i iz motoneurona (cijepanje SNAP-25), tada bi trebao utjecati na nociceptivnu bol, tj. trebao

bi smanjiti prijenos bolnih informacija na sinapsama središnjeg dijela aksona pseudounipolarnog neurona iz osjetnog ganglija.

Nekoliko je eksperimenata pokazalo da se egzocitoza neuropeptida iz živčanih okončina autonomnih neurona ne odvija uz pomoć SNAP-25 proteina (109,110). Tome u prilog idu i nalazi jednog istraživanja koje je pokazalo da većina perifernih i središnjih završetaka nemijeliniziranih aksona senzornih živaca, koji sadrže peptide, nema ili ima smanjenu ekspresiju ove proteinske molekule (108). Ovi rezultati sugeriraju da bi se neuroegzocitoza iz senzornih neurona mogla odvijati mehanizmom o kojem još ne znamo dovoljno, ali koji bi mogao biti neovisan od SNARE proteina. Stoga je moguće postaviti pitanje: da li je antinociceptivno djelovanje BT-A uopće povezano s cijepanjem SNAP-25?

5.1.2. Upalna bol

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 senzitizacije (133,134).

Druge dvije tvari koje se često koriste za uzrokovanje eksperimentalne upalne boli su karagenan i kapsaicin. Za razliku od formalina koji uzrokuje spontane bolne odgovore nakon injiciranja u šapu štakora, injiciranje karagenana i kapsaicina, u eksperimentalno uobičajenim dozama, primarno uzrokuje stanja povećane osjetljivosti na bolne podražaje (termalnu i mehaničku hiperalgeziju). Ove tvari djeluju različitim mehanizmima (129). Karagenan uzrokuje oštećenje tkiva i lučenje različitih medijatora iz okolnih stanica koji aktiviraju ili senzitiziraju nociceptore (118,135). Kapsaicin izravno podražuje vaniloidne, tzv. TRPV1 receptore, uzrokujući nastanak akcijskog potencijala, ali i lokalno lučenje neuropeptida iz perifernih završetaka (tzv. aksonski refleks) koji djeluju na okolne stanice, te na krvne žile (136). U oba slučaja dolazi do periferne senzitizacije nociceptora.

Prvo objavljeno pretkliničko ispitivanje antinociceptivnog djelovanja BT-A napravljeno je na formalinskom modelu upalne boli štakora u laboratorijima Allergana (87). Time je, po prvi puta, pokazano da BT-A dugotrajno smanjuje upalnu bol u štakora. Ispitivanjima na istom modelu u ovoj disertaciji dobiveni su rezultati koji se slažu, ali su u dosta detalja i različiti od tog prvog izvješća Cui i sur. (87).

Kod upalne boli uzrokovane formalinom, BT-A je utjecao na bolne odgovore samo u drugoj fazi testa. Tu se rezultati naših pokusa slažu s rezultatima tima iz Allergana (87).

Međutim, razlika postoji u nastupu antinociceptivnog učinka. Budući da su Cui i sur. (87) samo jednim mjerenjem pokazali da antinociceptivni učinak nastupa nakon 5 sati, postavlja se pitanje zašto su sva ostala mjerenja izvodili 5 dana nakon injiciranja toksina u šapu štakora?

Naši su rezultati pokazali da periferno primijenjen BT-A počinje djelovati tek nakon 5 dana. Niti u druga dva modela upalne boli (s karagenanom i kapsaicinom) BT-A, ako je primijenjen 1 dan prije upalnih tvari, nije utjecao na nastalu hiperalgeziju (129).

U našim ispitivanjima (u formalinskom i karagenanskom testu) nije bilo razlike u intenzitetu učinka između djelotvornih doza. Dok je u ovoj disertaciji najviša korištena doza BT-A 7 i.j./kg, Cui i sur. koriste i dvije velike doze od 15 i 30 i.j./kg, te govore o ovisnosti učinka o dozi toksina (87). Međutim, primjenom velikih doza prouzročili su i miorelaksaciju koja je, po našem mišljenju, mogla značajno utjecati na mjerenja i

doprinijeti lažno pozitivnim rezultatima. Niti u kliničkom ispitivanju djelovanja BT-A na kroničnu tenzionu glavobolju nije primijećena ovisnost učinka o dozi, tj. povećanjem doza učinak se nije pojačavao (78).

Antinociceptivno djelovanje BT-A Cui i sur. objašnjavaju inhibicijom lučenja glutamata iz perifernih aferentnih okončina senzornih živaca. Injiciranjem formalina izmjerena koncentracija glutamata u ekstracelularnoj tekućini tkiva šape se povećala za oko 220%. Iako je BT-A smanjio lučenje glutamata uzrokovano formalinom za 30-40%, ono je i dalje bilo za 130-150% veće u odnosu na bazalne uvjete (87).

5.1.3. Neuropatska bol

U našim pokusima prvi smo pokazali da BT-A, primijenjen periferno, smanjuje termalnu i mehaničku hiperalgeziju u životinja s perifernom neuropatijom u trajanju od barem 15 dana (130). Mehanizmi nastanka i održavanja neuropatske boli su kompleksni i uključuju različite dugotrajne promjene na mjestu ozljede živca, ali i središnje, kao što smo opisali u uvodnom poglavlju. Termalna i mehanička hiperalgezija nakon periferne ozljede živca vjerojatno su posljedica središnje senzitizacije. Smatramo da se dugotrajno djelovanje BT-A na smanjenje termalne i mehaničke preosjetljivosti teško može objasniti predloženim mehanizmom koji uključuje inhibiciju lučenja neuropeptida na periferiji. Smatramo da je mehanizam antinociceptivnog djelovanja BT-A vjerojatno posljedica interferiranja toksina s procesima središnje senzitizacije.

Ispitivanje djelovanja BT-A na dijabetičku neuropatiju izvodilo se na dva modela eksperimentalnog dijabetesa. U štakora, jednokratno injiciranje selektivnih toksina za β-stanice gušterače uzrokuje dijabetes ovisan o inzulinu koji je karakteriziran poliurijom, polidipsijom, gubitkom tjelesne mase, te promjenama u osjetljivosti na različite podražaje (137,138). Elektrofiziološki podaci pokazuju da su promjene u Aβ- i Aδ-vlaknima, poput promijenjene senzitivnosti i izbijanja, ili pak pojava spontane aktivnosti u primarnim aferentnim vlaknima, odgovorne za nastanak mehaničke hiperalgezije i alodinije (139).

Eksperimentalna dijabetička neuropatija u ovoj disertaciji uzrokovana je aloksanom, odnosno streptozotocinom, a bila je karakterizirana promjenama u osjetljivosti na mehanički i kemijski podražaj, dok su promjene u osjetljivosti na termalni podražaj bile vrlo različite.

Različitost odgovora na termalni podražaj u modelima eksperimentalne dijabetičke neuropatije nije rijetkost. U literaturi postoje navodi o termalnoj hipoalgeziji (140), hiperalgeziji (141) ili izostanku promjena termalne osjetljivosti (138) u dijabetičnih životinja. Jednom je studijom pokazano da termalna hiperalgezija (mjerena 4 tjedna nakon injiciranja streptozotocina) u dijabetičkih štakora s vremenom prelazi u termalnu hipoalgeziju (8 tjedana nakon indukcije dijabetesa). Iako su mehanizmi nastanka ovakvih različitih promjena u termalnoj osjetljivosti još velikim dijelom nerazjašnjeni, pokazalo se da su one ipak povezane s povećanjem metabolizma glukoze preko enzima aldoza reduktaze (142).

Povećanje bolnih odgovora uzrokovanih injiciranjem formalina u šapu dijabetičnih štakora u drugoj fazi testa praćeno je povećanim otpuštanjem SP i prostaglandina u dorzalnim rogovima kralješnične moždine (140,143), te posljedično i središnjom senzitizacijom.

Periferno primijenjen BT-A je, životinjama koje su razvile mehaničku hiperalgeziju, značajno smanjio preosjetljivost na mehanički podražaj u oba modela eksperimentalnog

dijabetesa. Od tri ispitivane doze BT-A djelovale su one od 5 i 7 i.j./kg, dok najmanja primijenjena doza 3 i.j./kg nije značajno mijenjala prag boli. Broj trzaja šapa injiciranih formalinom u životinja s dijabetesom je bio veći u odnosu na vrijednosti u životinja bez dijabetesa, ali statistički značajna razlika je dobivena samo u streptozotocinskom modelu. BT-A je smanjio bolne odgovore uzrokovane formalinom u oba modela, i to u dozama 5 i 7 i.j./kg, a u streptozotocinskom je modelu dijabetesa bila djelotvorna i doza od 3 i.j./kg. Kao i u eksperimentalne periferne neuropatije, učinak BT-A je bio značajan tek 5 dana nakon njegove periferne primjene, a trajao je barem 15 dana.

Ovim nalazima o dugotrajnom djelovanju BT-A na hiperalgeziju u eksperimentalnim modelima periferne i dijabetičke neuropatije, po prvi puta, ukazujemo na moguće povoljno djelovanje BT-A na barem neke od simptoma bolnih neuropatija u ljudi.

5.2. Učinci botulinum toksina tipa A na edem i ekstravazaciju proteina pri upali

Ispitivanje protuupalnog djelovanja BT-A u ovoj disertaciji izvodilo se na dva eksperimentalna modela upale. Korištene upalne tvari karagenan i kapsaicin djeluju različitim mehanizmima i uzrokuju upalu različitih obilježja.

Karagenan djeluje na stanice tkiva, dovodi do akumulacije neutrofila i oslobađanja različitih medijatora upale koji uzrokuju dvo-fazičnu upalnu reakciju karakteriziranu edemom (šape se povećaju i do 150%), te hiperalgezijom (129). Upala i hiperalgezija su najjačeg intenziteta 3-6 h nakon injiciranja karagenana (143).

Kapsaicin djeluje na drugačiji način. On se veže za ionotropne vaniloidne TRPV1 receptore, posljedica čega je ulazak kalcijevih iona u okončinu aferentnog vlakna i nastanak akcijskog potencijala koji se prenosi u središnje strukture, ali i antidromno u kolateralne okončine perifernog živca (145). Pritom, dolazi do egzocitoze SP i CGRP-a koji imaju autokrino djelovanje na sam nociceptor i parakrino na okolne stanice i krvne žile. Dolazi do otpuštanja medijatora upale koji direktno aktiviraju receptore ili ih senzibiliziraju, posljeduca čega je nastanak hiperalgezije. Uslijed vazodilatacije i ekstravazacije plazme u tkivo, nastaje hiperemija injiciranog područja i edem. Do upale i hiperalgezije dolazi već nekoliko minuta nakon injiciranja kapsaicina.

Mjerenje edema šape je pokazalo da BT-A u dozi od 5 i.j./kg, primijenjen periferno 5 dana prije karagenana, ne utječe na veličinu edema. Niti pri upali uzrokovanoj kapsaicinom BT-A, primijenjen 5 dana prije, čak niti u dozi od 10 i.j./kg, nije utjecao na ekstravazaciju kompleksa albumini-Evansovo modrilo iz krvnih žila.

U ovoj disertaciji BT-A, na dva različita modela eksperimentalne upale, nije pokazao protuupalno djelovanje.

Ovi su rezultati u suprotnosti s nalazom Cui i sur. koji su pokazali utjecaj periferno primijenjenog BT-A na edem šape uzrokovan formalinom (87). Autori su, na osnovu rezultata, zaključili da toksin djeluje protuupalno. Međutim, smatramo da ovi rezultati koji proizlaze iz samo jednog mjerenja, i to na modelu koji je karakteriziran upalnim promjenama slabog intenziteta, nisu dovoljan dokaz protuupalnog djelovanja BT-A. Jedan od nedostataka ovog pokusa je izbor korištene upalne tvari. Naime, injiciranje formalina uzrokovalo je svega 35%-tno povećanje debljine šape (edem). U tom pokusu je BT-A u dozi od 7 i.j./kg smanjio formalinski edem za oko 50% (s 35% na 18%), što se pokazalo

statistički značajnim. Doza od 3,5 i.j./kg nije utjecala na edem (87). Međutim, ova doza je smanjila bol uzrokovanu formalinom, što bi moglo ukazivati da ta dva fenomena, tj. bol i upala, nisu čvrsto povezana. Međutim, vjerojatnije odgovor leži u pitanju da li se može dovoljno precizno i sigurno izmjeriti razlika u tako maloj promjeni debljine šape, a koja bi bila dovoljno čvrst dokaz protuupalnog djelovanja? Za razliku od toga, u ovoj disertaciji edem uzrokovan karagenanom je višestruko veći i promjene od 50% vidjele bi se i prostim okom.

Nedostatak učinka na edem i na ekstravazaciju pri upali u ovoj disertaciji pokreću zanimljiva pitanja o djelotvornosti i potencijalnom mehanizmu (ako djelotvornost postoji) BT-A u migreni, o čemu u posljednje vrijeme ima više radova. Naime, klasična „trigeminovaskularna“ teorija migrene smatra da je ekstravazacija jedan od ključnih patofizioloških događaja, a koji sprečavaju „triptani“ (sumatriptan i drugi). Ako je BT-A djelotvoran pri migreni, morao bi, očito, imati posve različit mehanizam djelovanja.

5.3. Središnje mjesto djelovanja botulinum toksina tipa A

5.3.1. Intratekalna primjena botulinum toksina tipa A

U skladu s našom hipotezom da bi, barem dijelom, učinak BT-A mogao biti središnji (npr. na središnjim okončinama pseudounipolarnih senzornih neurona), istražili smo učinke intratekalne primjene BT-A.

Na formalinskom modelu upalne boli pokazali smo da intenzitet i trajanje djelovanja intratekalno primijenjenog BT-A nisu ovisni o dozi, što se slaže s rezultatima nakon periferne primjene toksina. Međutim, ovdje je najmanja djelotvorna doza toksina 7 puta manja od najmanje djelotvorne periferne doze (0,5 i.j./kg intratekalno *vs*. 3,5 i.j./kg periferno).

Druga bitna razlika leži u početku djelovanja BT-A (24 sata intratekalno *vs.* 5 dana periferno). Slični rezultati dobiveni su i na modelu eksperimentalne neuropatske boli, gdje je BT-A u dozi od 1 i.j./kg dugotrajno smanjio mehaničku hiperalgeziju s početkom djelovanja 24 sata nakon primjene.

5.3.2. Inhibicija aksonalnog transporta botulinum toksina tipa A

Najčešća eksperimentalna metoda farmakološke inhibicije aksonalnog transporta je intraneuronalno injiciranje neurotoksina kolhicina (5 mM) koji ireverzibilno depolimerizira tubulin i tako blokira aksonalni transport tjednima (146,147). Radi toga je kolhicin (koji ima i drugih farmakoloških učinaka, poput inhibicije migracije leukocita na mjesto upale) klasično sredstvo za farmakološko inhibiranje aksonalnog transporta.

Kolhicin je, primijenjen u *n. ishiadicus* prije injiciranja BT-A u šapu štakora, spriječio djelovanje toksina na mehaničku hiperalgeziju u modelu upalne boli uzrokovane karagenanom. Sam kolhicin nije utjecao na nastanak mehaničke hiperalgezije, ali je spriječio nastanak karagenanom-uzrokovane preosjetljivosti na termalni podražaj. Ovakvo djelovanje kolhicina na termalnu hiperalgeziju zabilježeno je i u drugim radovima, npr. na modelu neuropatske boli, a objašnjeno je time da je kolhicin, nakon primjene u ili na živac

u koncentracijama 5-50 mM, selektivno neurotoksičan za C-vlakna, dok su mehanonociceptori rezistentniji na djelovanje ovog neurotoksina (148).

U ovoj disertaciji smo, pokusima s kolhicinom, neizravno farmakološki pokazali da mjesto djelovanja BT-A nije periferno, već da vjerojatno uključuje „gornje“ dijelove nociceptivnog neurona kuda toksin dolazi retrogradnim transportom.

5.3.3. Metode imunodetekcije botulinum toksina tipa A

Razmišljajući o središnjem mjestu djelovanja BT-A, pokušali smo imunohistokemijski i metodom Western blot (imunoblotom) ustanoviti prisutnost toksina (ili fragmenta) u tkivima *n. ishiadicusa* i senzornih ganglija.

Do danas prisutnost BT-A nije istraživana u senzornim neuronima metodama imunodetekcije.

BT-A smo primijenili periferno u različitim vremenima prije uzimanja uzoraka (1, 3 i 5 dana) u dozi 7 i.j./kg (najveća korištena doza pri ispitivanju antinociceptivnog djelovanja). Nekoliko imunohistokemijskih pokusa je pokazalo razliku između živaca i senzornih ganglija kontrolne životinje i životinja tretiranih s BT-A. U životinja koje su primile BT-A pojavilo se smeđe obojenje u *n. ishiadicusu* i u tijelima neurona u senzornim ganglijima. Smeđa obojenost, specifična za imunoreaktivnost BT-A (DAB bojenje), je u perifernim aksonima bila očita nakon 24 sata, a u senzornim ganglijima se je pojavljivala postupno, da bi najjačeg intenziteta bila nakon 5 dana, što se podudara s nastupom antinociceptivnog djelovanja BT-A u eksperimentalnim modelima boli. Iako nikada nisu bili obojeni svi neuroni, nismo mogli sa sigurnošću utvrditi da li je imunoreaktivnost više prisutna u velikim ili u malim senzornim neuronima, koji se povezuju s nociceptivnim vlaknima.

U ovim postupcima imunodetekcije koristili smo tri različita primarna poliklonska antitijela (dva protiv cijele molekule neurotoksina i jedno protiv kratkog – biološki aktivnog lanca BT-A). Niti jedno od navedenih antitijela, prema našim saznanjima, nikad ranije nije bilo rabljeno za imunohistokemijsko dokazivanje prisutnosti BT-A, niti uopće postoje literaturni podaci o pokušajima detekcije BT-A u tkivima. Prema tome, bili smo prisiljeni sami tražiti „optimalne“ uvjete, razrjeđenja antitijela, te prilagođavali protokole kako bi dobili što manje nespecifično bojanje („background“), a pritom dobili dovoljno jaki signal.

U nekoliko smo pokusa dobili obojene (lažno imunoreaktivne) senzorne neurone i aksone kontrolnih životinja koje nisu tretirane s BT-A. Međutim, smatramo da je važno napomenuti da se niti u jednom pokusu nije obojilo samo živčano tkivo tih kontrolnih životinja i da su u gotovo svakom pokusu postojale vidljive razlike u intenzitetu obojenosti kontrolnih uzoraka i uzoraka tretiranih s BT-A. Sa svakim antitijelom postojao je barem jedan eksperiment u kojem su jasno bili obojeni samo senzorni neuroni i aksoni životinja koje su primile BT-A. Nadalje, kako smo već naveli, u „uspješnim“ pokusima najveći stupanj imunoreaktivnosti u tijelima senzornih neurona (senzorni gangliji) redovito smo nalazili nakon 5 dana, kada nastupa i antinociceptivni učinak. Nažalost, u ovom trenutku ne raspolažemo niti jednim literaturnim, a niti vlastitim znanstvenim podatkom koji bi na bilo koji način ukazivao na možebitno značenje pojave BT-A u tijelima neurona.

Western blot metodom smo željeli provjeriti da li možebitna histokemijska imunoreaktivnost doista označava prisutnost aktivnog toksina ili neaktivnih imunoreaktivnih fragmenta (metabolita) u tkivima perifernog živca.

Sa sličnim problemima kao i pri imunohistokemijskom određivanju susreli smo se i u Western blot metodi. Velik broj pokusa proveden je u traženju optimalnih uvjeta i protokola (mijenjanje pufera, vremena inkubacije, razrjeđenja primarnog i sekundarnog antitijela i sl.), kako bi se minimaliziralo nespecifično označavanje, a pri tome dobio dovoljno jaki signal, a koji bi mogli smatrati pozitivnim (ili negativnim) rezultatom. Međutim, i primjenom imunoblota smo u nekoliko pokusa dobili rezultate koje smo smatrali pozitivnima, tj. na uzorcima tkiva perifernog živca životinje tretirane s BT-A vidjeli smo dodatnu vrpcu („band“), i to otprilike na molekularnoj masi koja bi mogla odgovarati biološki aktivnom dijelu molekule toksina (kratki lanac – 50 kDa), s time što je u našim pokusima to bilo pomaknuto prema nešto većim molekularnim masama (procjena oko 55 kDa, što je nemoguće točno izmjeriti). Je li riječ o pomaku vrpci ili o nešto većem imunoreaktivnom proteinu, za sada nismo u stanju objasniti. U metodi Western blot nismo imali standard. Iz BT-A (Botox®, Allergan, SAD) koji su životinje dobivale, kratki lanac se oslobađa tek nakon ulaska u živčane okončine. Pokušaj da dobijemo kratki lanac iz Botox®-a njegovim inkubiranjem s tkivom nije uspio, vjerojatno zbog velikih „onečišćenja“ farmaceutskog pripravka (serumski albumini i drugi sastojci koji bi potpuno potamnili imunoblot).

U obje metode imunodetekcije, osim nespecifičnosti antitijela i mogućih pogrešaka u protokolima (čime bi se mogla objasniti slabija reproducibilnost rezultata), postoji i mogućnost da je količina BT-A u neuronima ispod razine osjetljivosti postupaka.

Za sada, na osnovu provedenih pokusa, rezultate dobivene metodama imunodetkcije ne možemo smatrati niti pozitivnima, ali niti negativnima, tj. na osnovu njih se ipak ne može isključiti mogućnost središnjeg mjesta djelovanja BT-A. Dapače, smatramo da nekoliko „pozitivnih“ pokusa, zajedno s farmakološkim nalazima govore u prilog središnjeg mjesta djelovanja BT-A. Važnost rezultata dobivenih metodama imunodetekcije, kojima bi se pokazalo mjesto djelovanja BT-A, je velika i stoga rezultate dobivene u ovoj disertaciji ne smatramo konačnima (više su preliminarnog tipa), već smo mišljenja da su oni poticaj za daljnji rad.

5.3.4. Kronična bilateralna mišićna hiperalgezija

Eksperimentalni modeli kronične mišićne boli karakterizirani su pojavom sekundarne mehaničke hiperalgezije (preosjetljivost izvan mjesta ozljede tkiva), i to bilateralno. Zato smo jedan od takvih eksperimentalnih modela (opetovano injiciranje kisele otopine 0,9% NaCl-a pH 4,0 u mišić) smatrali posebno važnim u istraživanju mogućeg središnjeg antinociceptivnog djelovanja BT-A. Naime, dok periferni mehanizmi, tj. senzitizacija nociceptora, doprinose nastanku primarne hiperalgezije, sekundarna hiperalgezija je vjerojatno posljedica promjena u SŽS-u (149,150), a nastanak hiperalgezije kontralateralno od mjesta injiciranja ukazuje na nužnu uključenost SŽS-a. Eksperimentalni dokazi središnjeg porijekla sekundarne hiperalgezije su nalazi da primjena anestetika na mjestu ozljede ne utječe na intenzitet već nastale sekundarne hiperalgezije (63); da injiciranje anestetika u periferni živac na strani ozljede, kao niti transekcija živca ne djeluju na kontralateralnu bol (151), ali da intratekalna primjena lokalnog anestetika (152), antagonista glutamatnih receptora (153) i agonista opioidnih receptora (154) smanjuju sekundarnu hiperalgeziju bilateralno. Na osnovu ovakvih nalaza, čini se da jednom nastala sekundarna hiperalgezija više ne ovisi o dolaznim informacijama s periferije.

Kontralateralno širenje hiperalgezije je vjerojatno posljedica plastičnih promjena u kralješničnoj moždini, a pretpostavlja se i u supraspinalnim centrima, iako za to još uvijek nema dovoljno eksperimentalnih dokaza (155).

Injiciranjem kisele otopine 0,9% NaCl-a pH 4,0 u mišić štakora aktiviraju se na kiselinu osjetljivi ionski kanali ASIC3 na perifernim okončinama senzornih vlakana u mišiću. Pritom dolazi do nastanka akcijskog potencijala koji se prenosi u kralješničnu moždinu (156). Razmak između dva injiciranja kisele otopine mora biti 2-5 dana (63). Nakon prve injekcije razvija se slaba mehanička preosjetljivost samo ipsilateralno, dok se nakon druge javlja hiperalgezija podjednakog intenziteta i na kontralateralnoj strani. Detaljni mehanizmi za sada nisu istraženi, a mi pretpostavljamo da prvo injiciranje u mišić uzrokuje određene početne akutne promjene u neuronima dorzalnog roga kralješnične moždine, koje će ponovljenim injiciranjem uzrokovati senzitizaciju neurona, te posljedično dovesti i do kontralateralnog širenja hiperalgezije. Pokazalo se da ponovljeno injiciranje kisele otopine uzrokuje povećanje središnjeg lučenja ekscitacijskih aminokiselina glutamata i aspartata koje, aktivirajući receptore na neuronima dorzalnog roga kralješnične moždine, doprinose senzitizaciji, te su vjerojatno ključni element pri prijelazu iz akutne u kroničnu bol u ovom modelu (157).

Budući da svi nalazi govore u prilog središnje senzitizacije kao najvažnijeg mehanizma koji doprinosi sekundarnoj bilateralnoj hiperalgeziji, odabrali smo ovaj model za ispitivanje mogućeg novog mehanizma antinociceptivnog djelovanja BT-A koji uključuje interferenciju s procesima središnje senzitizacije. Ovom disertacijom željeli smo istražiti: da li periferna primjena BT-A **prije** injiciranja prve injekcije kisele otopine može spriječiti nastanak hiperalgezije; da li periferno primijenjen BT-A **nakon** već nastale hiperalgezije može smanjiti njen intenzitet; djeluje li BT-A nakon izravne primjene u *n. ishiadicus* te da li inhibiranje aksonalnog transporta utječe na djelovanje toksina.

BT-A se pokazao djelotvornim u sprječavanju nastanka i u smanjenju već nastale sekundarne mehaničke hiperalgezije. Kao i u ostalim modelima, BT-A je djelovao 5 dana nakon primjene. Posebno je zanimljiv nalaz da, u oba slučaja, BT-A sprječava, odnosno smanjuje sekundarnu hiperalgeziju i na kontralateralnoj strani.

Farmakološka inhibicija aksonalnog transporta kolhicinom spriječila je učinak periferno primijenjenog BT-A. Toksin nije djelovao niti na ipsilateralnu, niti na kontralateralnu preosjetljivost.

Mogućnost anterogradne difuzije toksina, nakon njegove primjene u živac, isključili smo pokusom u kojem smo, nakon injiciranja BT-A u *n. ishiadicus,* živac prerezali ispod mjesta injiciranja. Rezultati su pokazali da BT-A i dalje djeluje na sekundarnu hiperalgeziju na kontralateralnoj strani. Time smo isključili postojanje hipotetskog refleksnog luka koji bi kretao od početnog utjecaja BT-A na periferne okončine senzornih neurona.

Bez obzira što je mehanizam nastanka obostrane mišićne hiperalgezije nakon injiciranja kisele otopine na molekularnoj razini nedovoljno poznat, ipak postoji slaganje da je pojava hiperalgezije na suprotnoj strani od injiciranja kisele otopine odraz senzitizacije i oblik sekundarne hiperalgezije (63,154-157). Zbog toga smatramo da je učinak BT-A na suprotnoj strani od mjesta njegove primjene i neovisnost toga o distalnim živčanim okončinama uvjerljivi pokazatelj da ključnu zadaću u antinociceptivnom djelovanju botulinum toksina ima središnja senzitizacija. Trenutno bi o molekularnom mehanizmu antinociceptivnog djelovanja BT-A mogli samo nagađati, što je očito veliki izazov za buduća istraživanja. Međutim, lijek koji bi nakon jednokratne primjene potencijalno tijekom tjedana i mjeseci uklanjao pretjeranu bol, vrijedan je tih izazova.

6. ZAKLJUČCI

Ovom disertacijom:

1. potvrdili smo da periferna primjena BT-A u štakora uklanja upalnu bol u formalinskom testu, ali i u eksperimentalnim modelima upalne boli uzrokovane karagenanom, odnosno kapsaicinom; učinak BT-A nakon periferne primjene nastupio je nakon 5 dana, a trajao je 30 dana (formalinski test);
2. potvrdili smo nalaze da BT-A ne djeluje na akutnu nociceptivnu bol;
3. istražujući edem uzrokovan karagenanom, našli smo da BT-A nema antiedematozno, odnosno protuupalno djelovanje;
4. mjerenjem ekstravazacije kompleksa proteina i Evansovog modrila tijekom upale uzrokovane kapsaicinom našli smo da BT-A smanjuje bol, ali da ne utječe na ekstravazaciju pri upali;
5. prvi smo pokazali da BT-A, pored upalne, uklanja eksperimentalnu neuropatsku bol uzrokovanu parcijalnom transekcijom *n. ishiadicusa* (do sada je o tome postojalo samo nekoliko nekontroliranih kliničkih opažanja na malom broju bolesnika), a pokazali smo da djeluje i na hiperalgeziju u eksperimentalnoj dijabetičkoj neuropatiji.

Istražujući mogućnost da je antinociceptivno djelovanje BT-A neovisno o perifernog lučenja neurotransmitora, našli smo da:

6. nakon intratekalne primjene, BT-A djeluje u nekoliko puta manjim dozama od perifernih i da mu učinak nastupa unutar 24 sata;
7. primjena kolhicina, inhibitora aksonalnog transporta, sprječava djelovanje periferno primijenjenog BT-A u modelu karagenanom uzrokovane upalne boli.

Kako bi pokazali nazočnost BT-A ili fragmenata BT-A u „gornjim“ dijelovima nociceptivnih neurona, koristili smo metode imunodetekcije toksina u tkivu *n. ishiadicusa* i senzornih ganglija. Pri tome smo:

8. s nekoliko imunohistokemijskih pokusa ukazali na moguću nazočnost toksina u *n.ishiadicusu* i senzornim ganglijima nakon njegove periferne primjene i
9. Western blot metodom u nekoliko pokusa ukazali na moguću nazočnost biološki aktivnog kratkog lanca (veličine 50 kDa) u tkivu *n. ishiadicusa*.

Iako su ovi rezultati preliminarni i zahtijevaju daljnji rad, ipak smatramo da oni ukazuju na moguće središnje mjesto antinociceptivnog djelovanja BT-A.

Na modelu kronične mišićne hiperalgezije, koja je najvećim dijelom posljedica središnje senzitizacije, pokazali smo da:

10. BT-A sprječava nastanak i smanjuje sekundarnu hiperalgeziju nakon periferne primjene ipsilateralno, ali i kontralateralno;
11. kolhicin sprječava djelovanje periferno primijenjenog BT-A na sekundarnu hiperalgeziju;
12. transekcija perifernog živca distalno od mjesta intraneuronalnog injiciranja BT-A ne sprječava djelovanje toksina na kontralateralnoj strani.

Temeljem nalaza da: **1. BT-A ne djeluje na akutnu nociceptivnu bol** koja se također prenosi lučenjem neurotransmitora u središnjim sinapsama, **2. toksin djeluje dugotrajno**, kao i temeljem novijih ispitivanja koja postavljaju **3. pitanje važnosti SNAP-25 proteina pri egzocitozi iz senzornih neurona**, pretpostavili smo da bi mehanizam djelovanja toksina mogao biti povezan s procesima središnje senzitizacije.

Rezultati ove disertacije ukazuju na moguće nove mehanizme antinociceptivnog djelovanja BT-A, vjerojatno na razini senzitizacije, što predstavlja izazov za daljnja istraživanja.

7. SAŽETAK

UVOD. Klinička opažanja ukazuju na moguće antinociceptivno djelovanje botulinum toksina tipa A (BT-A) u različitih bolnih stanja. Hipoteza ove disertacije je da BT-A ima antinociceptivno djelovanje koje uključuje interferenciju s procesima središnje senzitizacije. Ciljevi su bili: provjeriti postavljenu hipotezu, ispitati djelovanje BT-A na različite vrste eksperimentalne boli te istražiti protuupalno djelovanje.

MATERIJALI I METODE. Ispitivanja su se provodila na mužjacima štakora soja Wistar. BT-A je primijenjen subkutano (u šapu štakora), intratekalno i intraneuronalno (u *n. ishiadicus)*. Antinociceptivno djelovanje je ispitivano na eksperimentalnim modelima nociceptivne, upalne i neuropatske boli.
Istraživano je djelovanje BT-A na upalni edem i ekstravazaciju proteina pri upali.
Na modelu kronične mišićne hiperalgezije, ispitivano je djelovanje BT-A na sekundarnu bilateralnu hiperalgeziju.
Istraživan je utjecaj inhibicije aksonalnog transporta kolhicinom i distalnom transekcijom *n. ishiadicusa* na djelovanje BT-A.
Western blot metoda i imunohistokemija korištene su s ciljem detekcije toksina u *n. ishiadicusu* i senzornim ganglijima.

REZULTATI. BT-A je smanjio upalnu i neuropatsku bol, dok na nociceptivnu bol nije utjecao.
BT-A nije utjecao na edem, niti na ekstravazaciju proteina pri upali. BT-A je spriječio nastanak, i smanjio sekundarnu bilateralnu mehaničku hiperalgeziju.
Inhibicija aksonalnog transporta kolhicinom spriječila je djelovanje subkutano primijenjenog BT-A, dok transekcija *n.ishiadicusa* distalno od mjesta intraneuronalnog injiciranja BT-A nije utjecala na njegovo djelovanje na kontralateralnu bol. Preliminarni rezultati imunohistokemije i Western blot metode ukazuju na moguću nazočnost kratkog lanca toksina u *n. ishiadicusu* i senzornim ganglijima.

ZAKLJUČAK: Rezultati ove disertacije ukazuju na moguće nove primjene BT-A u liječenju bolnih neuropatija. Oni sugeriraju da antinociceptivno djelovanje BT-A uključuje interferenciju s mehanizmima središnje senzitizacije.

8. SUMMARY

OBJECTIVE. The hypothesis of this dissertation is that botulinum toxin type A (BT-A) has antinociceptive effect, which might include interference with mechanisms of central sensitization.

MATERIALS AND METHODS. Male Wistar rats were injected with BT-A subcutaneously, intrathecally and intraneuronally. Antinociceptive effect of BT-A was investigated in nociceptive, inflammatory and neuropathic pain. The influence of BT-A on secondary bilateral hyperalgesia was explored, too. Effect of BT-A on carrageenan-induced paw edema and capsaicin-induced extravasation of proteins coupled to Evans blue was investigated. Colchicine and transection of n. *ishiadicus* were used as tools to prevent the axonal transport of BT-A. Western blot and immunohistochemistry were employed in order to detect the toxin in *n. ishiadicus* and sensory ganglia.

RESULTS. BT-A decreased inflammatory and neuropathic pain, while it did not affect nociceptive pain. It did not show antiinflammatory effect.
BT-A reduced bilateral secondary hyperalgesia. Colchicine prevented the effectiveness of subcutaneous BT-A, while distal transection of *n. ishiadicus* did not affect the influence of intraneuronal BT-A on contralateral pain.

CONCLUSION. BT-A reduces inflammatory pain and symptoms of neuropathic pain. Antinociceptive effect of BT-A probably involves interference with central sensitization.

Antinociceptive effect of botulinum toxin type A

Lidija Bach-Rojecky

Zagreb, 2006.

9. LITERATURA

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

2. Working Group on Civilian Biodefense. Botulinum toxin as a biological weapon. Medical and public health management. JAMA 2001;285:1059-70.

3. Dolly O. Synaptic transmission: inhibition of neurotransmitter release by botulinum toxins. Headache 2003;43:S16-24.

4. Lacy DB, Stevens RC. Sequence homology and structural analysis of the clostridial neurotoxins. J Mol Biol 1999;291(5):1091-104.

5. Simpson LL. Identification of the major steps in botulinum toxin action. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2004;44:167-93.

6. Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. Physiol Rev 2000;80:718-38.

7. Montecucco C, Schiavo G, Pantano S. SNARE complexes and neuroexocytosis: how many, how close? Trends Biochem Sci 2005;30:367-72.

8. Davletov K, Bajohrs M, Binz T. Beyond BOTOX: advantages and limitations of individual botulinum neurotoxins. Trends Neurosci 2005;28(8):446-52.

9. de Paiva A, Meunier FA, Molgo J, Aoki KR, Dolly JO. Functional repair of motor endplates after botulinum neurotoxin type A poisoning: biphasic switch of synaptic activity between nerve sprouts and their parent terminals. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96(6):3200-5.

10. Foran PG, Mohammed N, Lisk GO i sur. Evaluation of the therapeutic usefulness of botulinum neurotoxin B, C1, E and F compared with the long lasting type A. J Biol Chem 2003;278:1363-71.

11. Meunier FA, Lisk G, Sesardic D, Dolly JO. Dynamics of motor nerve terminal remodeling unveiled using SNARE-cleaving botulinum toxins: the extent and duration are directed by the sites of the SNAP-25 truncation. Mol Cell Neurosci 2003;22:454-66.

12. Jankovic J. Botulinum toxin in clinical practice. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2004;75(7):951-7.

13. Aoki KR, Guyer B. Botulinum toxin type A and other botulinum toxin serotypes: a comparative review of biochemical and pharmacological actions. Eur J Neurosci 2001;8 Suppl5:21-9.

14. Jankovic J, Orman J. Botulinum A toxin for cranial-cervical dystonia: a double-blind, placebo-controlled study. Neurology 1987;37(4):616-23.

15. Costa J, Espirito-Santo C, Borges A i sur. Botulinum toxin type A therapy for cervical dystonia. Cochrane Database Syst Rev 2005;25;1:CD003633.

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

17. Flanders M, Tischler A, Wise J i sur. Injection of type A botulinum toxin into extraocular muscles for correction of strabismus. Can J Ophthalmol 1987;22:212–7.

18. Benedetto AV. The cosmetic uses of botulinum toxin type A. Int J Dermatol 1999;38:641-55.

19. Wasiak J, Hoare B, Wallen M. Botulinum toxin A as an adjunct to treatment in the management of the upper limb in children with spastic cerebral palsy. Cochrane Database Syst Rev 2004;4:CD003469.

20. Naumann MK, Lowe NJ. Effect of botulinum toxin type A on quality of life measures in patients with excessive axillary sweating: a randomized controlled trial. Br J Dermatol 2002;147:1218–26.

21. Courey MS, Garrett CG, Billante CR i sur. Outcomes assessment following treatment of spasmodic dysphonia with botulinum toxin. Ann Otol Rhinol Laryngol 2000;109:819–22.

22. Djebbari R, du Montcel S-T, Sangla S, Vidal JS, Gallouedec G, Vidailhet M. Factors predicting improvement in motor disability in writer's cramp treated with botulinum toxin. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2004;75:688-91.

23. Brin MF, Lyons KE, Doucette J i sur.. A randomized, double masked, controlled trial of botulinum toxin type A in essential hand tremor. Neurology 2001;56:1523–8.

24. Lamotte D, Thoumie P. Multiple sclerosis and botulinum toxin. Ann Readapt Med Phys 2003;46:299-302.

25. Naumann M, Jost W. Botulinum toxin treatment of secretory disorders. Mov Disord 2004;19 Suppl 8:137-41.

26. Pal PK, Calne DB, Calne S i sur. Botulinum toxin A as a treatment for drooling saliva in PD. Neurology 2000;89:1659-63.

27. Keegan DJ, Geerling G, Lee JP, Blake G, Collin JR, Plant GT. Botulinum toxin treatment for hyperlacrimation secondary to aberrant regenerated seventh nerve palsy or salivary gland transplantation. Br J Ophthalmol 2002;86(1):43-6.

28. Arad-Cohen N, Blitzer A. Botulinum toxin treatment for symptomatic Frey's syndrome. Otolaryngol Head Neck Surg 2000;122:237-40.

29. Schiano TD, Parkman HP, Miller LS i sur. Use of botulinum toxin in the treatment of achalasia. Dig Dis 1998;16:14–22.

30. Arroyo A, Perez F, Serrano P, Candela F, Lacueva J, Calpena R. Surgical versus chemical (botulinum toxin) sphincterotomy for chronic anal fissure: long-term results of a prospective randomized clinical and manometric study. Am J Surg 2005;189:429-34.

31. Ron Y, Avni Y, Lukovetski A i sur. Botulinum toxin type-A in therapy of patients with anismus. Dis Colon Rectum 2001;44(12):1821-6.

32. Grosse J, Kramer G, Stohrer M. Success of repeat detrusor injections of botulinum A toxin in patients with severe neurogenic detrusor overactivity and incontinence. Eur Urol 2005;47:653-9.

33. Chuang YC, Chiang PH, Huang CC, Yoshimura N, Chancellor MB. Botulinum toxin type A improves benign prostatic hyperplasia symptoms in patients with small prostates. Urology 2005;66(4):775-9.

34. Hendry SHC, Hsiao SS, Bushnell MC. Somatic sensation. U: Fundamental Neuroscience, drugo izdanje, urednici: Squire LR, Roberts JL, Spitzer NC, Zigmond MJ, McConnell SK, Bloom FE; Academic Press, San Diego 2003, str. 677-99.

35. Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. Nature 2001;413:203-10.

36. Hanani M. Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. Brain Res Rev 2005;48:457-76.

37. Cervero F. Sensory innervation of the viscera: peripheral basis of visceral pain. Physiol Rev 1994;74:95-138.

38. Mense S. Nociception from skeletal muscle in relation to clinical muscle pain. Pain 1993;54:241-89.

39. Petersen-Felix S, Curatolo M. Neuroplasticity - an important factor in acute and chronic pain. Swiss Med Wkly 2002:132:273-8.

40. Carlton SM. Peripheral excitatory amino acids. Curr Opin Pharmacol 2001;1:52-6.

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

42. Jin JH, Nishioka H, Wakabayashi K, Fujita T, Yonehara N. Effect of morphine on the release of excitatory amino acids in the rat hind instep: pain is modulated by the interaction between the peripheral opioid and glutamate systems. Neuroscience 2006;138(4):1329-39.

43. Sann H, Pierau F-K. Efferent function of C-fiber in nociception. Z Rheumatol 1998;57(2):8-15.

44. Carlton SM, Coggeshall RE. Inflammation induced changes in peripheral glutamate receptor populations. Brain Res 1999;820:63-70.

45. Brain SD, Cox HM. Neuropeptides and their receptors: innovative science providing novel therapeutic targets. Brit J Pharmacol 2006;147:S202-11.

46. Fields FL, Heinricher MM, Mason P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. Annu Rev Neurosci 1991;14:219-45.

47. Melzack R, Wall P. Pain mechanisms: a new theory. Science 1965;150:971-99.

48. Vanegas H, Schaible H-G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? Brain Res Rev 2004;46:295-309.

49. Scholz J, Woolf CJ. Can we conquer pain? Nat Neurosci 2002;5:1062-7.

50. Brooks J, Tracey I. From nociception to pain perception: imaging the spinal and supraspinal pathways. J Anat 2005;207:19-23.

51. Woolf CJ, Costigan M. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. PNAS 1999;96(14):7723-30.

52. Sommer C. Painful neuropathies. Curr Opin Neurol 2003;16:623-8.

53. Harden RN. Chronic neuropathic pain: mechanisms, diagnosis and treatment. The Neurologist 2005;11(2):111-22.

54. Baron R. Mechanisms of disease: neuropathic pain - clinical perspective. Nat Clin Pract Neurol 2005;2(2):95-106.

55. Zimmermann M. Pathophysiology of neuropathic pain. Eur J Pharmacol 2001;429:23-37.

56. Coull JA Boudreau D, Watkins LR i sur. Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. Nature 2003;424:938-42.

57. Weiseler-Frank J Maiser SF, Watkins LR i sur. Central proinflammatory cytokines and pain enhancement. Neurosignals 2005;14:166-74.

58. Jones TL, Sorkin LS. Basic neurochemistry of central sensitization. Semin Pain Med 2003;1(3):184-92.

59. Ji R-R, Woolf CJ. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. Neurobiol Dis 2001;8:1-10.

60. Watkins LR i sur. Glial activation: a driving force for pathological pain. Trends Neurosci 2001;24:450-5.

61. Ji R-R, Kohno T, Moore KA, Woolf CJ. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? Trends Neurosci 2003;26:696-705.

62. Coutaux A, Adam F, Willer J-C, Le Bars D: Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. Joint Bone Spine 2005;72:359-71.

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

64. Brower V. New paths to pain relief. Nat Biotech 2000;18:387-92.

65. Jankovic J, Schwartz K. Botulinum toxin injections for cervical dystonia. Neurology 1990;40(2):277-80.

66. Argoff CE. A focused review on the use of botulinum toxins for neuropathic pain. Clin J Pain 2002;18 Suppl6:S177-81.

67. Dodick DW, Mauskop A, Elkind AH, DeGryse R, Brin MF, Silberstein SD; BOTOX CDH Study Group. Botulinum toxin type A for the prophylaxis of chronic daily headache: subgroup analysis of patients not receiving other prophylactic medications: a randomized double-blind, placebo-controlled study. Headache 2005;45(4):315-24.

68. Rozen D, Sharma J. Treatment of tension-type headache with Botox: a review of the literature. Mt Sinai J Med 2006;73(1):493-8.

69. Chilson CN, Brown SJ. Role of botulinum toxin type A in the prophylactic treatment of migraine headaches. Ann Pharmacother 2005;39(12):2081-5.

70. Lu CS, Chen RS, Tsai CH. Double-blind, placebo-controlled study of botulinum toxin injections in the treatment of cervical dystonia. J Formos Med Assoc 1995;94(4):189-92.

71. Childers MK, Wilson DJ, Gnatz SM, Conway RR, Sherman AK. Botulinum toxin type A use in piriformis muscle syndrome: a pilot study. Am J Phys Med Rehabil 2002 Oct;81(10):751-9.

72. Lang AM. A preliminary comparison of the efficacy and tolerability of botulinum toxin serotypes A and B in the treatment of myofascial pain syndrome: a retrospective, open-label chart review. Clin Ther 2003;25(8):2268-78.

73. Porta M. A comparative trial of botulinum toxin type A and methylprednisolone for the treatment of myofascial pain syndrome and pain from chronic muscle spasm. Pain 2000;85:101-5.

74. Ferrante FM, Bearn L, Rothrock R, King L: Evidence against trigger point injection technique for the treatment of cervicothoracic myofascial pain with botulinum toxin type A. Anesthesiology 2005;103:377–83.

75. Foster L, Clapp L, Erickson M, Jabbari B. Botulinum toxin A and chronic low back pain: a randomized double blind study. Neurology 2001;56:1290–3.

76. Nixdorf DR, Heo G, Major PW. Randomized controlled trial of botulinum toxin A for chronic myogenous orofacial pain. Pain 2002;99:465-73.

77. Barwood S, Baillieu C, Boyd R i sur. Analgesic effects of botulinum toxin A: a randomized, placebo-controlled clinical trial. Dev Med Child Neurol 2000;42(2):116-21.

78. Relja M, Telarovic S. Botulinum toxin in tension-type headache. J Neurol 2004;251Suppl 1:I/12-4.

79. Padberg M, de Brujin SFTM, de Haan RJ, Tavy DLJ. Treatment of chronic tension type headache with botulinum toxin: a double-blind, placebo-controlled clinical trial. Cephalalgia 2004;24:675-80.

80. Schulte-Mattler WJ, Krack P; BoNTTH Study Group. Treatment of chronic tension-type headache with botulinum toxin A: a randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter study. Pain 2004;109(1-2):110-4.

81. Silberstein S, Mathew N, Saper J, Jenkins S. Botulinum toxin type A as a migraine preventive treatment. For the BOTOX Migraine Clinical Research Group. Headache 2000;40(6):445-50.

82. Conway S, Delplanche C, Crowder J, Rothrock J. Botox therapy for refractory chronic migraine. Headache 2005;45(4):355-7.

83. Evers S, Vollmer-Haase J, Schwaag S, Rahmann A, Husstedt IW, Frese A. Botulinum toxin A in the prophylactic treatment of migraine - a randomized, double-blind, placebo-controlled study. Cephalalgia 2004;24(10):838-43.

84. Allam N, Brasil-Neto JP, Brown G, Tomaz C. Injections of botulinum toxin type A produce pain alleviation in intractable trigeminal neuralgia. Clin J Pain 2005;21:182-4.

85. Klein AW. The therapeutic potential of botulinum toxin. Dermatol Surg 2004;30:452-5.

86. Smith CP, Radziszewski P, Borkowski A, Somogyi GT, Boone TB, Chancellor MB. Botulinum toxin A has antinociceptive effects in treating interstitial cystitis. Urology 2004;64:871-5.

87. Cui M, Khanijou S, Rubino J, Aoki KR. Subcutaneous administration of botulinum toxin type A reduces formalin-induced pain. Pain 2004;107(1-2):125-33.

88. Aoki KR. Review of a proposed mechanism for the antinociceptive action of botulinum toxin type A. Neurotoxicol 2005;26(5):785-93.

89. Chuang Y-C, Yoshimura N, Huang C-C, Chiang P-H, Chancellori MB. Intravesical botulinum toxin A administration produces analgesia against acetic acid induced bladder responses in rats. J Urol 2004;172:1529-32.

90. Vemulakonda VM, Somogyi GT, Kiss S, Salas NA, Boone TB, Smith CP. Inhibitory effect of intravesically applied botulinum toxin A in chronic bladder inflammation. J Urol 2005;173:621-4.

91. Smith CP, Vemulakonda VM, Kiss S, Boone TB, Somogyi GT. Enhanced ATP release from rat bladder urothelium during chronic bladder inflammation: effect of botulinum toxin A. Neurochem Int 2005;47:291-7.

92. Atiemo H, Wynes J, Chuo J, Nipkow L, Sklar GN, Chai TC. Effect of botulinum toxin on detrusor overactivity induced by intravesical adenosine triphosphate and capsaicin in a rat model. Urology 2005;65:622-6.

93. Khera M, Somogyi GT, Kiss S, Boone TB, Smith CP. Botulinum toxin A inhibits ATP release from bladder urothelium after chronic spinal cord injury. Neurochem Int 2004;45:987-93.

94. Khera M, Somogyi GT, Salas NA, Kiss s, Boone TB, Smith CP. In vivo effects of botulinum toxin A on visceral sensory function in chronic spinal cord-injured rats. Urology 2005;66:208-12.

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

96. Grumelli C, Verderio C, Pozzi D, Rossetto O, Montecucco C, Matteoli M. Internalization and mechanism of action of clostridial toxins in neurons. Neurotoxicol 2005;26(5):761-7.

97. Black JD, Dolly JO. Selective locations of acceptors for botulinum neurotoxin A in the central and peripheral nervous systems. Neuroscience 1987;23:767-79.

98. Gundersen CB, Howard BD. The effects of botulinum toxin on acetylcholine metabolism in mouse brain slices and synaptosomes. J Neurochem 1978;31:1005-13.

99. Ashton AC, Dolly JO. Characterization of the inhibitory action of botulinum neurotoxin type A on the release of several transmitters from rat cerebrocortical synaptosomes. J Neurochem 1988;50(6):1808-16.

100. Sanchez-Prieto J, Sihra TS, Evans D, Ashton A, Dolly JO, Nicholls DG. Botulinum toxin A blocks glutamate exocytosis from guinea-pig cerebral cortical synaptosomes. Eur J Biochem 1987;165(3):675-81.

101. Najib A, Pelliccioni P, Gil C, Aguilera J. Clostridium neurotoxins influence serotonin uptake and release differently in rat brain synaptosomes. J Neurochem 1999;72(5):1991-8.

102. Berquist F, Niazi HS, Nissbrandt H. Evidence of different exocytosis pathways in dendritic and terminal dopamine release in vivo. Brain Res 2002;950:245-53.

103. Durham PL, Cady R, Cady B. Regulation of calcitonin gene-related peptide secretion from trigeminal nerve cells by botulinum toxin type A: implication for migraine therapy. Headache 2004;44:35-43.

104. Bigalke H, Dreyer F, Bergey G. Botulinum A neurotoxin inhibits non-cholinergic synaptic transmission in mouse spinal cord neurons in culture. Brain Res 1985;360(1-2):318-24.

105. Williamson LC, Halpern JL, Montecucco C, Brown JE, Neale EA. Clostridial neurotoxins and substrate proteolysis in intact neurons: botulinum neurotoxin C acts on synaptosomal-associated protein of 25 kDa. J Biol Chem 1996;271(13):7694-9.

106. Welch MJ, Purkiss JR, Foster KA. Sensitivity of embryonic rat dorsal root ganglia neurons to Clostridium botulinum neurotoxins. Toxicon 2000;38:245-58.

107. Duggan MJ, Quinn CP, Chaddock JA i sur. Inhibition of release of neurotransmitters from rat dorsal root ganglia by a novel conjugate of a Clostridium botulinum toxin A endopeptidase fragment and Erythrina cristagalli lectin. J Biol Chem 2002;277(38):34846-52.

108. Morris JL, König P, Shimizu T, Jobling P, Gibbins IL. Most peptide-containing sensory neurons lack proteins for exocytotic release and vesicular transport of glutamate. J Comp Neurol 2005;481:1-16.

109. Morris JL, Jobling P, Gibbins IL. Differential inhibition by botulinum neurotoxin A of cotransmitters released form autonomic vasodilatator neurons. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2001;281:H2124-32.

110. Morris JL, Jobling P, Gibbins IL. Botulinum neurotoxin A attenuates release of norepinephrine but not NPY from vasoconstrictor neurons. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002;283:H2627-35.

111. Habermann E. ^{125}I-labbeled neurotoxin from Clostridium botulinum A: preparation, binding to synaptosomes and ascent to the spinal cord. Naunyn-Schmiedebergh's Arch Pharmacol 1974;281:47-56.

112. Wiegand H, Erdmann G, Wellhöner HH. ^{125}I-labbeled botulinum A neurotoxin: pharmacokinetics in cats after intramuscular injection. Naunyn-Schmiedebergh's Arch Pharmacol 1976;292:161-5.

113. Tang-Liu DD, Aoki KR, Dolly JO i sur. Intramuscular injection of ^{125}I-botulinum neurotoxin complex versus ^{125}I-botulinum-free neurotoxin: time course of tissue distribution. Toxicon 2003;42:461-9.

114. Menendez L, Lastra A, Hidalgo A, Baamonde A. Unilateral hot-plate test: a simple and sensitive method for detecting central and peripheral hyperalgesia in mice. J Neurosci Methods 2002;113:91-7.

115. Randall LO, Selitto JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflammed tissue. Arch Int Pharmacodyn 1957;61:409-19.

116. Sawynok J, Reid AR, Doak GJ. Caffeine antinociception in the rat hot-plate and formalin tests and locomotor stimulation: involvement of noradrenergic mechanisms. Pain 1995;61:203-13.

117. Kalso E, Kontinen VK, Aarnisalo AA, Idänpään-Heikkilä JJ, Panula P. Neuropeptide FF in the rat spinal cord during carrageenan inflammation. Peptides 1997;18:287-92.

118. Honore P, Catheline G, Le Guen S, Besson JM. Chronic treatment with systemic morphine induced tolerance to the systemic and peripheral antinociceptive effect of morphine on both carrageenin induced mechanical hyperalgesia and c-fos expression in awake rats. Pain 1997;71:99-108.

119. Gilchrist HD, Allard LA, Simone DA. Enhanced withdrawal responses to heat and mechanical following intraplantar injection of capsaicin in rats. Pain 1996;67:179-88.

120. Sun R-Q, Lawand NB, Willis WD. The role of calcitonin gene-related peptide in the generation and maintance of mechanical allodynia and hyperalgesia in rats after intradermal injection of capsaicin. Pain 2003;104:201-8.

121. Lindenlaub T, Sommer C. Partial sciatic nerve transection as a model of neuropathic pain: a qualitative and quantitative neuropathological study. Pain 2000;89:97-106.

122. Lee JH, Cox DJ, Mook DG, McCarty RC. Effect of hyperglycemia on pain threshold in alloxan-diabetic rats. Pain 1990;40:105-7.

123. Malcangio M, Tomlinson. A pharmacological analysis of mechanical hyperalgesia in streptozotocin/diabetic rats. Pain 1998;76:151-7.

124. Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenin-induced oedema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. Proc Soc Exp Biol Med 1962;111:544-7.

125. Schmelz M, Petersen LJ. Neurogenic inflammation in human and rodent skin. News Physiol Sci 2001;16:33-7.

126. Kawabata A, Kuroda R, Minami T, Kataoka K, Taneda M. Increased vascular permeability by a specific agonist of protease-activated receptor-2 in rat hindpaw. Brit J Pharmacol 1998;125:419-22.

127. Kingery WS, Guo TZ, Poree LR, Maze M. Colchicine treatment of the siatic nerve reduces neurogenic extravasation, but does not affect nociceptive thresholds or collateral sprouting in neuropathic or normal rats. Pain 1998;74:11-20.

128. Laemlli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227(5259):680–5.

129. Bach-Rojecky L, Lacković Z. Antinociceptive effect of botulinum toxin type A in rat model of the carrageenan and capsaicin induced pain. Croat Med J 2005;46:201-208.

130. Bach-Rojecky L, Relja M, Lacković Z. Botulinum toxin type A in experimental neuropathic pain. J Neural Transm 2005;112:215-219.

131. Blersch W, Schulte-Mattler WJ, Przywara S, May A, Bigalke H, Wohlfarth K. Botulinum toxin A and the cutaneous nociception in humans: a prospective double-blind, placebo-controlled, randomized study. J Neurol Sci 2002;205:59-63.

132. Krämer HH, Angerer C, Erbguth E, Schmelz M, Birklein F. Botulinum toxin A reduces neurogenic flare but has almost no effect on pain and hyperalgesia in human skin. J Neurol 2003;250:188-93.

133. Wheeler-Aeto H, Porreca F, Cowan A. The rat paw formalin test: comparison of noxious agents. Pain 1990;40:229-38.

134. Coderre TJ, Vaccarino AL, Melzack R. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. Brain Res 1990;535:155-8.

135. Tsuruoka M, Arai YC, Nomura H, Matsutani K, Willis WD. Unilateral hindpaw inflammation induces bilateral activation of the locus coeruleus and the nucleus subcoeruleus in the rat. Brain Res Bull 2003;61:117-23.

136. Szolcsanyi J. Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. Neuropeptides 2004;38:377-84.

137. Calcutt NA. Experimental models of painful diabetic neuropathy. J Neurol Sci 2004;220:137-9.

138. Wei M, Ong L, Smith MT i sur. The streptozotocin diabetic rats as a model of the chronic complications of human diabetes. Heart Lung Circ 2003;12(1):44-50.

139. Khan GM, Chen S-R, Pan H-L. Role of primary afferent nerve in allodynia caused by diabetic neuropathy in rats. Neuroscience 2002;114:291-9.

140. Calcutt NA, Stiller CO, Gustafsson H, Malmberg AB. Elevated substance-P-like immunoreactivity levels in spinal dialysates during the formalin test in normal and diabetic rats. Brain Res 2000;856:20-7.

141. Lee JH, McCarty R. Glycemic control of pain threshold in diabetic and control rats. Physiol Behav 1990;47:225-30.

142. Calcutt NA, Freshwater JD, Mizisin AP. Prevention of sensory disorders in diabetic Sprague-Dawley rats by aldose reductase inhibition or treatment with ciliary neurotrophic factor. Diabetologia. 2004 ;47(4):718-24.

143. Freshwater JD, Svensson CI, Malmberg AB, Calcutt NA. Elevated spinal cyclooxigenase and prostaglandin release during hyperalgesia in diabetic rats. Diabetes 2002;51:2249-55.

144. Romero A, Planas E, Poveda R, Sanchez S, Pol O, Puig MM. Anti-exudative effects of opioid receptor agonists in a rat model of carrageenan-induced acute inflammation of the paw. Eur J Pharmacol 2005;511:207-17.

145. Planells-Cases R, Garcia-Sanz, Morenilla-Palao, Ferrer-Montiel A. Functional aspects and mechanisms of TRPV1 involvement in neurogenic inflammation leads to thermal hyperalgesia. Pflugers Arch - Eur J Physiol 2005;451:151-9.

146. Colburn RW, DeLeo JA. The effect of perineural colchicine on nerve injury-induced spinal glial activation and neuropathic pain behavior. Brain Res Bull 1999;49:419-22.

147. Schuligoi R. Effect of colchicine on nerve growth factor-induced leukocyte accumulation and thermal hyperalgesia in the rat. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 1998;358:264-9.

148. Yamamoto T, Yaksh TL. Effects of colchicine applied to the peripheral nerve on the theramal hyperalgesia evoked with chronic nerve constriction. Pain 1993;55:227-33.

149. Koltzenburg M, Wall PD, McMahon SB. Does the right side knows what the left is doing? Trends Neurosci 1999;22:122-7.

150. Graven-Nielsen T, Arendt-Nielsen. Peripheral and central sensitization in musculoskeletal pain disorders: an experimental approach. Curr Rheumat Reports 2002;4:313-21.

151. LaMotte RH, Shain CN, Simone DA, Tsai EFP. Neurogenic hyperalgesia: psychophysical studies of underlying mechanisms. J Neurophysiol 1991;66:190–211.

152. Coderre TJ, Wall PD. Ankle joint urate arthritis in rats: an alternative animal model of arthritis to that produced by Freund's adjuvant. Pain 1987;28:379-93.

153. Skyba EW, Sluka KA. Effects of NMDA and non-NMDA ionotropic glutamate receptor antagonists on the development and maintenance of hyperalgesia induced by repeated intramuscular injection of acidic saline. Pain 2002;98:69–78.

154. Sluka KA, Rohlwing JJ, Bussey RA, Eikenberry SA, Wilken JM. Chronic muscle pain induced by repeated acid injection is reversed by spinally administered μ-, and δ-, but not κ-, opioid receptor agonists. J Pharmacol Exp Ther 2002;302:1146–50.

155. Radhakrishnan R, Moore SA, Sluka KA. Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. Pain 2001;104:567-77.

156. Sluka KA, Price MP, Breese NM, Stucky CL, Wemmie JA, Welsh MJ. Chronic hyperalgesia induced by repeated acid injections in muscle is abolished by the loss of ASIC3, but not ASIC1. Pain 2003;106:229-39.

157. Skyba DA, Lisi TL, Sluka KA. Excitatory amino acid concentrations increase in the spinal cord dorsal horn after repeated intramuscular injection of acidic saline. Pain 2005;119(1-3):142-9.

10. ŽIVOTOPIS

Ime:		Lidija Bach-Rojecky, rođena Kukec
Datum rođenja:		26. listopada 1973. godine
Mjesto rođenja:		Bjelovar, Hrvatska
Nacionalnost:		Hrvatica
Državljanstvo:		hvatsko
Zaposlenje:		Zavod za farmakologiju Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Školovanje:	1992-1997	Studij farmacije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu
	1997-2002	Poslijediplomski studij «Farmaceutske znanosti» na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu
	2002.	Magistar znanosti iz područja Farmacija/Biomedicina
Radno iskustvo:	1997-2002	Mlađi asistent na Zavodu za farmakologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
	2002 -	Asistent na Zavodu za farmakologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
Članstva:		- Hrvatsko društvo farmakologa - European Pharmacological Societies Association (EPHAR) - International Union of Pharmacological Societies (IUPHAR) - Hrvatsko društvo za znanost o laboratorijskim životinjama
Kongresi:	1997 -	5 međunarodnih kongresa 5 domaćih kongresa
	2003	FENS/IBRO European Pain School, Siena, Italija
***Objavljeni radovi*:**		6 znanstvenih radova (2 CC) 4 stručna rada