

# Imunohistokemijska detekcija botulinum toksina u spinalnim regijama nakon supraspinalne primjene

---

Šandl, Tin

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:163:162990>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-28**



Repository / Repozitorij:

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



**Tin Šandl**

**Imunohistokemijska detekcija botulinum toksina  
u spinalnim regijama nakon supraspinalne  
primjene**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

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

*Posebno se zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Lidiji Bach-Rojecky za svu pomoć tijekom izrade diplomskog rada i na mogućnosti uvida u znanstveno djelovanje Zavoda za farmakologiju.*

*Zahvaljujem se poslijedoktorandici dr. sc. Višnji Drinovac Vlah na pomoći oko izvođenja eksperimentalnog dijela, ali i savjetima tijekom izrade cjelokupnog rada.*

*Veliko hvala dugujem svojoj obitelji i prijateljima koji su mi uvijek bili oslonac i pružili bezuvjetnu podršku kroz školovanje.*

*Na kraju, najveće hvala Heleni Rastiji koja je cijeloj priči dala pravi smisao.*

## SADRŽAJ

<b>1</b>	<b>UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1	Povijest botulinum toksina .....	1
1.1.1	Struktura botulinum toksina serotipa A .....	2
1.1.2	Mehanizam djelovanja botulinum toksina .....	3
1.1.3	Indikacije i primjena botulinum toksina .....	6
1.2	Bol i podjela boli .....	7
1.2.1	Putovi boli .....	8
1.2.2	Periferna i središnja senzitivacija .....	9
1.3	Djelovanje botulinum toksina tipa A na bol .....	10
<b>2</b>	<b>OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>18</b>
3.1	Životinje i tkivo za analizu .....	18
3.1.1	Botulinum toksin .....	18
3.2	Eksperimentalni protokol za analizu tkiva .....	19
3.2.1	Tkivo .....	20
3.2.2	Kemikalije .....	20
3.3	Imunohistokemija .....	20
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>22</b>
4.1	Anatomske posebnosti leđne moždine .....	22
4.2	Imunoreaktivnost pocijepanoga SNAP-25 nakon spinalne primjene BT-A .....	26
4.3	Imunoreaktivnost pocijepanoga SNAP-25 nakon supraspinalne primjene BT-A .....	29
<b>5</b>	<b>RASPRAVA</b> .....	<b>31</b>
<b>6</b>	<b>ZAKLJUČAK</b> .....	<b>35</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>37</b>
<b>8</b>	<b>SAŽETAK / SUMMARY</b> .....	<b>43</b>
<b>TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD</b>		

# 1 UVOD

## 1.1 Povijest botulinum toksina

Još je davno, u 16. stoljeću, poznati švicarsko-njemački liječnik Paracelsus ustvrdio: „Svaki je lijek otrovan, samo o dozi ovisi hoće li to zaista biti“. Botulinum toksin potvrđuje ovu tezu iskazujući kako toksičan, tako i terapijski učinak, ovisno o primijenjenoj dozi. *Clostridium botulinum* anaerobna je gram pozitivna sporogena bakterija koja proizvodi botulinum toksin, jedan od najpoznatijih prirodnih bioloških neurotoksina (Nigam i Nigam, 2010). Poznato je 7 serotipova botulinum toksina (A-G), među kojima serotip A pokazuje najveću potentnost (Barash i Arnon, 2014). Najnovije je otkriće serotip H, hibrid s domenama sličnim serotipu A i serotipu F (Maslanka i sur., 2016). Intoksikacija serotipovima A, B, E i u manjoj mjeri serotipom F uzrokuje bolest zvanu botulizam, a put unosa toksina može biti nedovoljno obrađenom hranom, infekcijom rane ili kolonizacijom gastrointestinalnog sustava nakon konzumiranja hrane bogate bakterijskim sporama. Serotipovi C i D iskazuju toksičnost jedino u životinja. Zbog mogućnosti apsorpcije i inhalacijskog trovanja putem dišnog sustava, još od 2. svjetskog rata razmatra se njegova primjena u bioterorizmu. Rani simptomi botulizma započinju umorom, slabošću, vrtoglavicom, zamagljenjem vida, suhoćom usta i poteškoćama u govoru i gutanju, a bolest se razvija do respiratorne paralize i silazne mišićne slabosti, što može rezultirati smrću. Letalna doza kristaličnoga botulinum toksina tipa A za čovjeka od 70kg iznosi 0.09–0.15µg primijenjenog intravenski ili intramuskularno, 0.70–0.90µg inhalacijski te 70µg oralno (Arnon i sur., 2001).

U drugoj polovici 20. stoljeća počinje se istraživati terapijski, ali i kozmetički učinak botulinum toksina. Otkrićem mehanizma djelovanja kao inhibitora oslobađanja acetilkolina iz kolinergičkih motoričkih neurona na neuromuskularnoj ploči, botulinum toksin prvi je puta našao kliničku primjenu u terapiji strabizma (Scott, 1981). FDA<sup>1</sup> je odobrila primjenu botulinum toksina u poremećajima vezanim uz abnormalnu mišićnu kontrakciju, kao i poremećajima vezanim uz autonomni živčani sustav, poput hiperhidroze (Oh i Chung, 2015). Različiti spastični poremećaji povezani s oštećenjima središnjeg živčanog sustava (trauma, moždani udar, multipla skleroza) liječe se botulinum toksinom. Kao profilaksa i terapijska mogućnost, botulinum toksin odobren je za liječenje kronične tenzijske migrene (Escher i

---

<sup>1</sup>FDA- Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*)

sur., 2017). Danas je možda najpoznatija upotreba botulinum toksina u estetske svrhe, za ravnanje bora (Nigam i Nigam, 2010). U Sjedinjenim su Državama injekcije botulinum toksina najučestaliji kozmetički tretman (Wise i Greco, 2006). Doze upotrijebljene u kozmetičke svrhe mnogo su niže od doza korištenih za terapiju (<http://www.botox.com>). Kao posljedica rezultata mnogih prekliničkih i kliničkih ispitivanja u kojima je dokazana inhibicija lučenja ekscitatorskih nociceptivnih neuropeptida (glutamat, SP<sup>2</sup>, CGRP<sup>3</sup>) i ekspresije TRPV1<sup>4</sup> receptora vezanih uz prijenos bolnog impulsa, sve više pozornosti usmjerava se na pristup botulinum toksinu kao potencijalnoj terapijskoj opciji za liječenje boli (Aoki, 2005).

### 1.1.1 Struktura botulinum toksina serotipa A

Botulinum toksin A (BT-A) je neurotoksin molekulske mase 900 kDa<sup>5</sup>. Sintetiziran je kao jednolančani polipeptid (150 kDa) povezan s netoksičnim proteinima koji stabiliziraju i štite neurotoksin od proteolize (slika 1). BT-A sastoji se od teškog lanca (~100 kDa) vezanog preko jedne disulfidne Cys-Cys veze za laki lanac (~50 kDa). Teški se lanac sastoji od dvije domene: C-terminalna domena potrebna je za visokoafinitetno vezanje toksina za receptor na neuronu, a N-terminalna domena uključena je u membransku translokaciju toksina. Laki lanac posjeduje o cinku ovisnu endoproteaznu aktivnost i cijepa protein SNAP-25<sup>6</sup>, čime sprječava oslobađanje acetilkolina iz vezikule presinaptičkog neurona (Dickerson i sur., 2014; Brian, 2009).

---

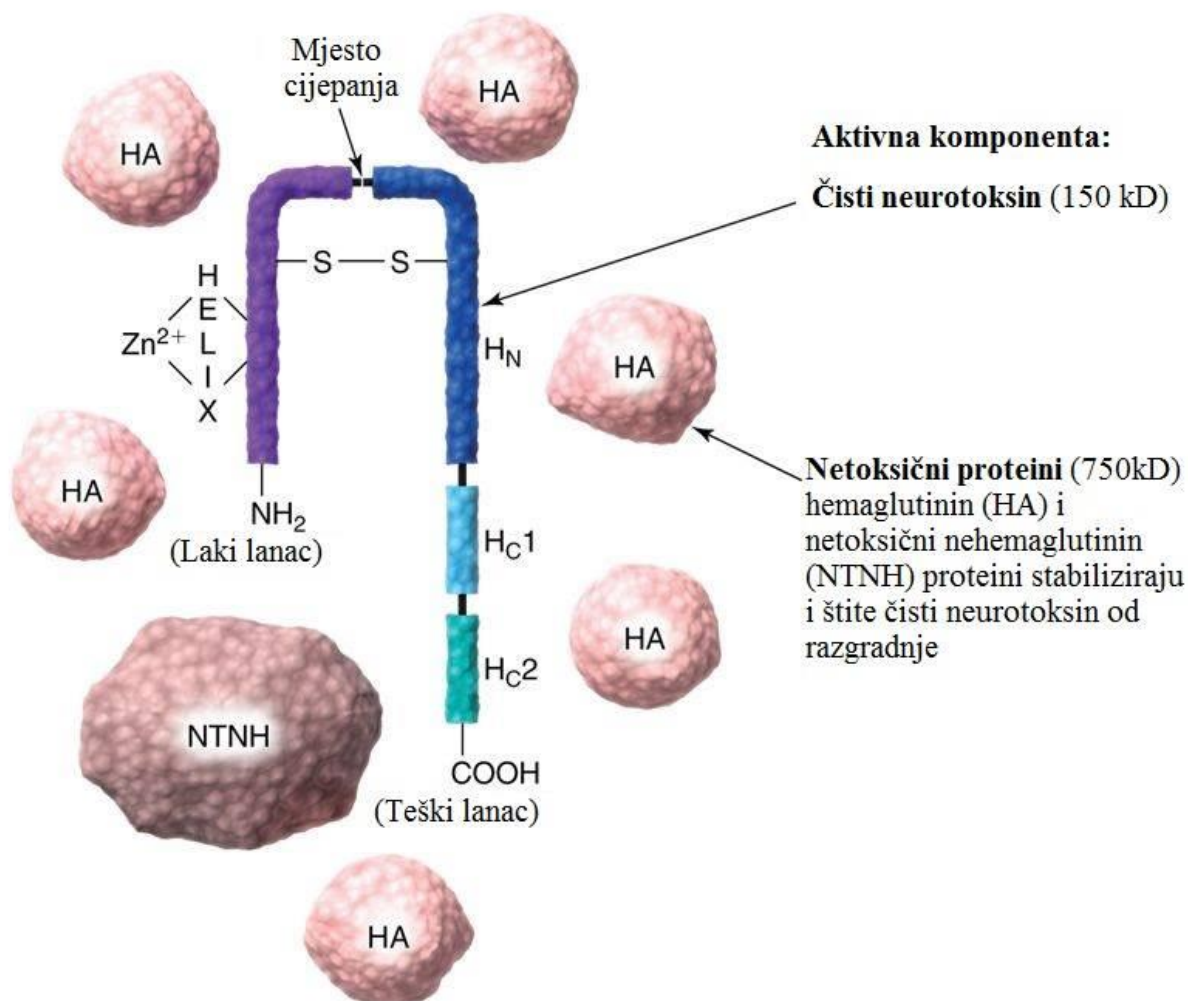
<sup>2</sup> SP- tvar P (engl. *Substance P*)

<sup>3</sup> CGRP- peptid srodan produktu kalcitoninskog gena (engl. *Calcitonin gene-related polypeptide*)

<sup>4</sup> TRPV1- vaniloidni receptor tipa 1 (engl. *Transient receptor potential vanilloid type 1*)

<sup>5</sup> Da- Dalton; atomska jedinica mase (engl. *Unified atomic mass unit*)

<sup>6</sup> SNAP-25- sinaptosomalni protein molekulske mase od 25kDa (engl. *Synaptosomal Associated Protein of 25 kDa*)



Slika 1. Shematski prikaz građe botulinum toksina tipa A. Netoksični proteini okružuju neurotoksin i štite ga od razgradnje.

(prilagođeno prema: <https://pocketdentistry.com/esthetics-and-dermatologic-pharmaceuticals/>)

### 1.1.2 Mehanizam djelovanja botulinum toksina

Serotipovi botulinum toksina inhibiraju oslobađanje neurotransmitora acetilkolina iz presinaptičkih motoričkih neurona na neuromuskularnoj ploči. Posljedica je te inhibicije paraliza mišića nakon intramuskularne primjene. Četiri su glavna mjesta djelovanja botulinum toksina u čovjekovu tijelu: neuromuskularna ploča, autonomni ganglij, postganglijski parasimpatički živčani završetak i postganglijski simpatički živčani završetak koji oslobađa acetilkolin (Nigam i Nigam, 2010). Oslobađanje acetilkolina slijedi nakon depolarizacije živčanog završetka motoričkog neurona, a posredovano je transportnim proteinskim

kompleksom SNARE<sup>7</sup> (slika 2). Djelovanje botulinum toksina može se razdvojiti u nekoliko ključnih koraka:

- 1) aplikacija BT-A u ciljano tkivo
- 2) vezanje BT-A preko C-terminalne domene teškog lanca na visokoafinitetne glikoproteinske strukture receptora na kolinergičkim živčanim završecima  
(visoka selektivnost za kolinergičke sinapse)
- 3) endocitoza i internalizacija toksina u intracelularnu vezikulu
- 4) zbog niskoga pH unutar endosoma: translokacija teškog lanca u membranu endosoma i stvaranje kanala unutar membrane endosoma
- 5) strukturalna promjena lakoga lanca, odvajanje lakoga od teškog lanca i translokacija lakoga lanca preko membrane endosoma u citosol neurona, posredovana N-terminalnim krajem teškoga lanca botulinum toksina
- 6) cijepanje proteina SNAP-25 pomoću lakoga lanca, koji je o cinku ovisna endopeptidaza
- 7) sprječavanje fuzije vezikule neurotransmitora acetilkolina i presinaptičke membrane uzrokovano hidrolizom komponenata proteinskoga kompleksa SNARE  
(Cai i sur., 2006; Dressler i Adib, 2005)

SNAP-25, sintaksin i sinaptobrevin dio su SNARE kompleksa koji je odgovoran za egzocitozu acetilkolina iz presinaptičkog neurona u sinaptičku pukotinu. Laki lanac botulinum toksina različito djeluje na komponente SNARE kompleksa, ovisno o serotipovima toksina. Botulinum toksin tipa A cijepa SNAP-25 tako da mu uklanja 9 aminokiselina s C-terminalnoga kraja, dok serotip E cijepa 26 aminokiselina s C-kraja SNAP-25. Laki lanac botulinum toksina serotipa C1 cijepa sintaksin, dok serotipovi B, D, F, G kao metu cijepaju VAMP<sup>8</sup> (sinaptobrevin) na različitim mjestima unutar lanca. Zbog razlike u mjestu djelovanja serotipova botulinum toksina, različito je trajanje paralize mišića, a samim time i učestalost primjene. Inhibicija egzocitoze acetilkolina serotipova A i C1 traje 4-6 mjeseci, dok serotip E djeluje 4-6 tjedana (Brian, 2009). Blokada kolinergičkih živčanih vlakana dovodi do posljedičnog remodeliranja neuromuskularne veze i stvaranja novih funkcionalnih ogranaka motoričkih neurona koji preuzimaju ulogu egzocitoze acetilkolina. Originalne se okončine i sinapse regeneriraju 3 mjeseca nakon intramuskularne primjene BT-A i tada se bilježi ponovna mišićna funkcija, dok novonastale okončine propadaju (Jankovic, 2004). Ovisno o ciljanom tkivu, BT-A može blokirati egzocitozu acetilkolina i na neuroefektornoj ploči

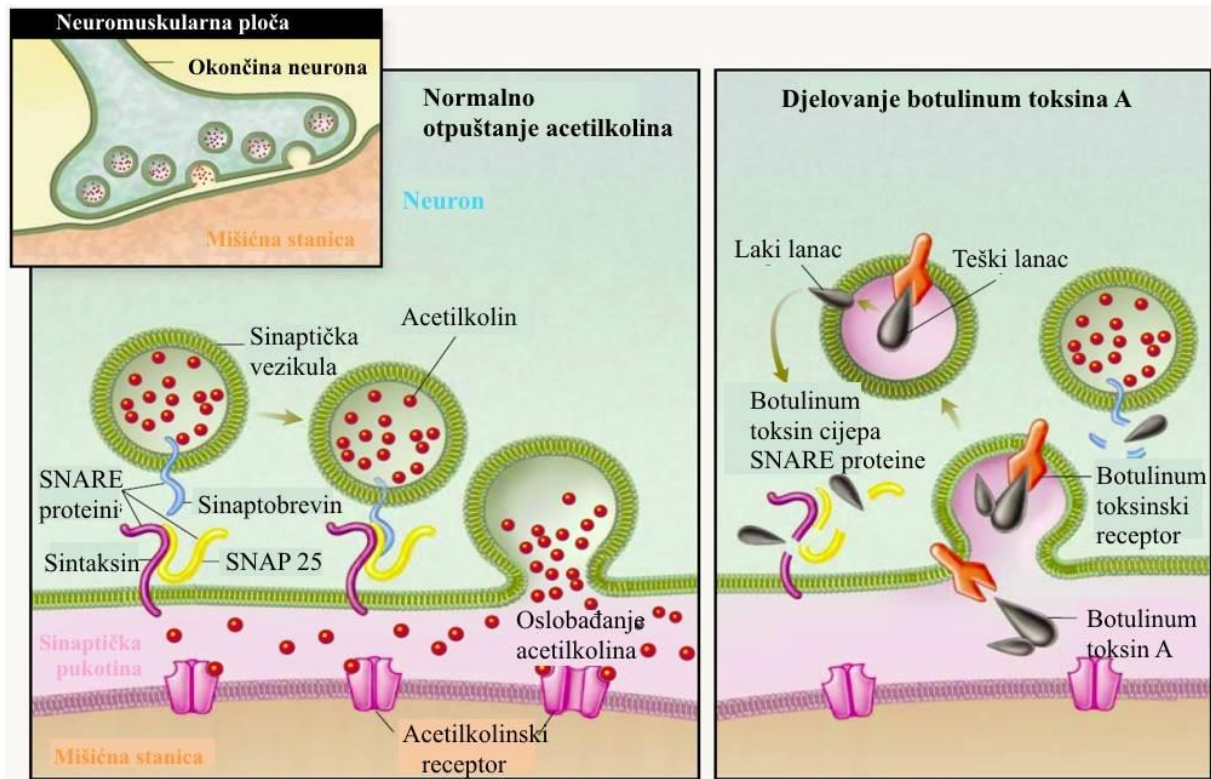
---

<sup>7</sup> SNARE- topljivi kompleks N-etilmaleimid osjetljivi čimbenik vezanja proteinskih receptora (engl. *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor*)

<sup>8</sup> VAMP- membranski protein povezan s vezikulom (engl. *Vesicle-associated membrane protein*)



žlijezda znojnica, suznih žlijezda, žlijezda slinovnica i glatkih mišića, što ga čini prikladnim za upotrebu u kliničkim stanjima povezanim s navedenim tkivima i organima (Brian, 2009).



Slika 2. Uvećani prikaz neurotransmisije acetilkolina na neuromuskularnoj ploči: A-oslobađanje acetilkolina u sinaptičku pukotinu posredovano SNARE proteinskim kompleksom; B-inhibicija oslobađanja acetilkolina iz presinaptičke membrane uzrokovana BT-A posredovanom hidrolizom komponenti SNARE kompleksa.

(prilagođeno prema: Rowland, 2002)

### 1.1.3 Indikacije i primjena botulinum toksina

Njemački liječnik i pisac J.Kerner još je u 19. stoljeću predložio hipotezu o upotrebi botulinum toksina („*sausage poison*“) kao terapijske mogućnosti (Erbguth i Naumann, 1999). Godine 1980. dr. Alan B.Scott prvi je puta upotrijebio botulinum toksin na ljudima u terapiji strabizma. FDA je 1989. godine BT-A pod zaštićenim nazivom BOTOX<sup>®</sup> odobrila za terapiju strabizma, blefarospazma i hemifacijalnog spazma u pacijenata mlađih od 12 godina. Krajem 2000. godine FDA odobrava BT-A u novoj indikaciji za liječenje cervikalne distonije. Velika Britanija zatim odobrava BOTOX<sup>®</sup> u terapiji aksilarne hiperhidroze, dok Kanada legalizira BT-A u sljedećim indikacijama: aksilarna hiperhidroza, fokalna spastičnost, kozmetičke svrhe u korekciji bora. FDA 2002. godine odobrava korištenje BOTOX<sup>®</sup>-a u privremenoj korekciji vertikalnih glabelarnih bora (bore mrštenja), a 2011. proširuje indikacije u kozmetičke svrhe za ravnanje bora lica. Godine 2004. FDA odobrava BOTOX<sup>®</sup> u terapiji primarne aksilarne hiperhidroze (znojenje ispod pazuha otporno na lokalnu terapiju antiperspiransima). Zahvaljujući novim otkrićima i saznanjima, ubrzano se radi na uvođenju BT-A u liječenje poremećaja povezanih s kroničnom boli, no FDA još nije odobrila BT-A u indikacijama vezanim za terapiju boli, osim u profilaksi i liječenju kronične migrene.

Danas se u kliničkoj praksi primjenjuju botulinum toksini tipa A i B koji se na tržištu nalaze kao:

a) onabotulinumtoxin A - BOTOX<sup>®</sup> - odobren u sljedećim indikacijama: cervikalna distonija, primarna aksilarna hiperhidroza, blefarospazam, strabizam, neurogenetska hiperaktivnost detrusora, kronična migrena, spastičnost gornjih ekstremiteta

- BOTOX<sup>®</sup> Cosmetic (*Allergan*) - odobren u sljedećim indikacijama: vertikalne glabelarne bore (bore mrštenja), periorbitalne bore (bore smijeha)

b) abobotulinumtoxin A - Dysport<sup>®</sup> (*Ipsen Biopharmaceuticals*) - odobren u sljedećim indikacijama: spastičnost gornjih i donjih ekstremiteta, cervikalna distonija, vertikalne glabelarne bore

c) incobotulinumtoxin A - Xeomin<sup>®</sup> (*Merz*) - odobren u sljedećim indikacijama: spastičnost gornjih ekstremiteta, blefarospazam, cervikalna distonija, vertikalne glabelarne bore

d) rimabotulinumtoxin B - Myobloc<sup>®</sup> (*Solstice Neurosciences*) - odobren u sljedećim indikacijama: cervikalna distonija

(<https://emedicine.medscape.com/>)

Doze svih komercijalno dostupnih botulinum toksina izražavaju se u internacionalnim jedinicama (I.U.<sup>9</sup>), a pripravci se međusobno razlikuju po potentnosti. Jedna I.U. botulinum toksina odgovara količini toksina koja nakon intraperitonealne primjene uzrokuje smrt 50% ženki Swiss-Webster miševa (LD<sub>50</sub>)<sup>10</sup> (Hoffman i Helveston, 1986). Xeomin<sup>®</sup> je prvi preparat botulinum toksina koji sadrži samo neurotoksičnu komponentu od 150 kDa, dok ostali sadrže pročišćeni kompleks neurotoksina ([www.xeomin.com](http://www.xeomin.com)).

U Hrvatskoj je 2005. godine odobren prvi komercijalni BT-A (Dysport<sup>®</sup>), a danas se na tržištu nalaze BOTOX<sup>®</sup>, Vistabel<sup>®</sup> i Xeomin<sup>®</sup> ([www.almp.hr](http://www.almp.hr)). U skladu sa sve širom primjenom botulinum toksina i sve većim brojem odobrenih indikacija u terapiji, nova otkrića otvaraju vrata primjeni BT-A u liječenju boli. U modelima nociceptivne, upalne i neuropatske boli BT-A pokazuje analgetski učinak, no točan mehanizam djelovanja još uvijek nije u potpunosti otkriven, što je jedan od ključnih preduvjeta za odobrenje BT-A u terapiji boli (Bach-Rojecky i sur., 2010; Bach-Rojecky i sur., 2008; Aoki, 2005).

## 1.2 Bol i podjela boli

Bol, glavni indikator patoloških stanja u organizmu, ujedno je i zaštitni mehanizam koji pridonosi otklanjanju štetnoga podražaja kaskadnim reakcijama i promjenama u perifernom i/ili središnjem živčanom sustavu.

Bol se može podijeliti na više načina:

- a) prema duljini trajanja: akutna, kronična
  - b) prema podrijetlu: kutana, visceralna, koštano-mišićna...
  - c) prema mehanizmu nastanka i patofiziološkim karakteristikama: nociceptivna, upalna, neuropatska...
  - d) prema intenzitetu: blaga do umjerena, umjereno jaka, vrlo jaka
- ([www.paineurope.com](http://www.paineurope.com))

---

<sup>9</sup>I.U.- međunarodna jedinica (engl. *International Unit*)

<sup>10</sup>LD<sub>50</sub>- letalna doza 50% (engl. *Median lethal dose*)

### 1.2.1 Putovi boli

Receptori za bol (nociceptori) slobodni su živčani završeci koji provode različite bolne podražaje u mozak gdje nastaje osjećaj boli. Nociceptori, za razliku od ostalih osjetnih receptora, ne pokazuju učinak desenzitizacije nakon ponavljajućeg podražaja, već naprotiv pojačavaju osjet boli. Dvije vrste živčanih vlakana prenose impuls iz periferije prema leđnoj moždini: C vlakna su tanka i nemijelinizirana vlakna koja akcijski potencijal provode brzinom 0.5-2 m/s, dok su A $\delta$  vlakna širega promjera i mijelinizirana, a prenose impuls brzinom 6-30 m/s. Obje vrste vlakana stražnjim spinalnim korijenima ulaze u leđnu moždinu, odakle prema višim centrima u mozgu odlaze dvama putevima, neospinotalamičkim i paleospinotalamičkim putem. Impulsi prenošeni A $\delta$  vlaknima završavaju u marginalnoj lamini (lamini I) stražnjih rogova leđne moždine, te se neospinotalamičkim traktom anterolateralnim kolumnama prenose do talamusa, točnije do ventrobazalnoga kompleksa, dok manji broj završava u retikularnim područjima moždanoga debla. Određen broj vlakana završava na stražnjoj skupini talamičkih jezgara, odakle se signali prenose u druga bazalna područja mozga i u somatosenzoričku koru. Živčani sustav ovakvu brzu i oštru bol koja se prenosi neospinotalamičkim putem može lokalizirati mnogo točnije od spore trajne boli. Impulsi koji se prenose perifernim C vlaknima (za sporu i dugotrajniju bol) završavaju u gelatinoznoj tvari (lamine II i III) stražnjih rogova leđne moždine, te se do mozga prenose paleospinotalamičkim putem. Signal dalje prolazi anterolateralnim kolumnama kroz jedan ili više neurona kratkih vlakana, da bi dugim aksonima završio u talamusu, retikularnim formacijama produžene moždine, ponsa i mezencefalona, u tektalnom području mezencefalona ili u sivom području oko akvedukta (Guyton i Hall, 2006).

Glutamat je glavni ekscitacijski neurotransmitor u prijenosu boli, a svoj ekscitacijski učinak iskazuje preko ionotropnih AMPA<sup>11</sup> i NMDA<sup>12</sup> receptora koji se nalaze na perifernim završecima aferentnih živaca, neuronima dorzalnoga roga leđne moždine i neuronima u talamusu (Carlton, 2001). Zbog aktivacije nociceptora na periferiji se luči glutamat i doprinosi nocicepciji, no on se također otpušta u upalnom stanju, zajedno sa supstancijom P (SP) i peptidom srodnim produktu kalcitoninskoga gena (CGRP). Osim postsinaptički, glutamat djeluje presinaptički preko NMDA receptora na membranama središnjih grana aferentnoga senzornog vlakna u dorzalnom rogu leđne moždine, što posljedično povećava lučenje

---

<sup>11</sup>AMPA-  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kiselina glutamatni receptor (engl.  *$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*)

<sup>12</sup>NMDA- N-metil-D-aspartat glutamatni receptor (engl. *N-Methyl-D-aspartate*)

neurotransmitora u središnje sinapse (Milan, 1999). SP, CGRP, somatostatin, faktor lučenja kortikotropina, kolecitokinin, vazoaktivni intestinalni peptid (VIP) oslobađaju se iz aferentnoga senzornog vlakna i važni su prijenosnici bolnih impulsa. Adenozin tri-fosfat (ATP), dušikov (II) oksid (NO), prostaglandini medijatori su ne-živčanoga porijekla u dorzalnom rogu leđne moždine i mogu djelovati ekscitacijski ili inhibicijski. U leđnoj moždini i talamusu nalaze se ekscitacijski i inhibicijski interneuroni koji preko raznih medijatora reguliraju prijenos boli. Ekscitacijski djeluju glutamat, SP, neurotensini, VIP (Guyton i Hall, 2006). Važni inhibicijski interneuroni koji sprječavaju transmisiju bolnih impulsa su opioidni, kolinergički i interneuroni koji djeluju preko GABA<sup>13</sup>-e (Bach Rojecky, 2006). Serotonin i noradrenalin dio su silaznoga endogenog sustava kontrole boli koji započinje u moždanoj kori i supkortikalnim tvorbama, a seže do ulaza bolnih podražaja u središnji živčani sustav. Na razini leđne moždine sudjeluju u modulaciji prijenosa bolnog impulsa (Guyton i Hall, 2006).

### 1.2.2 Periferna i središnja senzitivacija

Periferna je senzitivacija stanje povećane podražljivosti nociceptora uzrokovano lokalnim otpuštanjem medijatora upale, poput bradikinina i prostaglandina. Njihovim vezanjem za metabotropne receptore spregnute s G-proteinima na membranama perifernih aferentnih živčanih završetaka, dolazi do aktivacije protein kinaza A i C te kaskadnih reakcija koje dovode do fosforilacije ionskih kanala i receptora. Kao rezultat, smanjuje se prag aktivacije receptora (TRPV1 receptora) i ionskih kanala, tj. povećava se podražljivost membrane živčanih završetaka.

Središnja senzitivacija, tj. povećana podražljivost neurona drugoga reda u dorzalnom rogu leđne moždine, uključuje različite i vrlo kompleksne promjene u leđnoj moždini, a nastaje kao posljedica periferne senzitivacije i učestalog podraživanja nociceptora i prijenosa impulsa prema leđnoj moždini. Središnja senzitivacija može biti brza i odgođena.

Hiperalgizija je stanje povećane osjetljivosti na bolne podražaje. Primarna hiperalgizija nastaje na mjestu ozljede tkiva ili živca, a posljedica je fizioloških i farmakoloških promjena karakteristika C i A $\delta$  vlakana. Sekundarna hiperalgizija javlja se na mjestu izvan ozljede, a nastaje zbog povećane podražljivosti središnjih neurona.

---

<sup>13</sup>GABA- gama aminomaslačna kiselina (engl.  *$\gamma$ -aminobutyric acid*)

Alodinija je stanje pojačane osjetljivosti na podražaje koji nisu bolni, najčešće dodir i hladnoću. Posljedica je kompleksnih promjena unutar živčanoga sustava, a mehanizam uključuje: aktivaciju A $\beta$  vlakana, središnju senzitivaciju, reorganizaciju neurona dorzalnoga roga leđne moždine, aktivaciju senzitiviranih neurona u dorzalnom rogu leđne moždine C vlaknima osjetljivim na kapsaicin (Bach-Rojecky, 2006).

### 1.3 Djelovanje botulinum toksina tipa A na bol

Analgetski učinak BT-A ne korelira uvijek s učinkom BT-A na paralizu mišića, što ukazuje da je mehanizam djelovanja BT-A na bol neovisan o mehanizmu odgovornom za paralizu mišića. Nakon aplikacije intramuskularne (i.m.<sup>14</sup>) injekcije BT-A u pacijenata s mišićnim temporomandibularnim poremećajem, uočena je slabost žvačnih mišića i redukcija boli. Osam tjedana nakon aplikacije BT-A, mišićna je funkcija vraćena na normalnu vrijednost, dok je odsustvo boli zadržano (Tarsy i First, 1999).

Dobro je poznato da širenje bolnih impulsa ovisi o lučenju određenih neurotransmitora i neuropeptida, uključujući glutamat, SP i CGRP. Brojna pretklinička ispitivanja *in vitro* i *in vivo* pokazala su sposobnost botulinum toksina da inhibira otpuštanje medijatora boli, te se pretpostavilo da botulinum toksin smanjuje bol blokadom otpuštanja „bolnih“ medijatora (Galazka i sur., 2015). Welch. i sur. (2000) uočili su da BT-A inhibira lučenje SP u kulturi ganglija dorzalnih korijena štakora. CGRP i SP se izlučuju iz okončina primarnoga aferentnog neurona na periferiji i u dorzalnim korijenima leđne moždine, pa je učinak BT-A na njihovo izlučivanje iz neurona posebno važan za djelovanje na bol (Aoki, 2005). CGRP i SP djeluju lokalno vazodilatatorno i doprinose perifernoj senzitivaciji u upalnom procesu, a indirektno pojačavaju središnju senzitivaciju. Stoga njihovom inhibicijom BT-A može smanjiti osjetljivost i bol u područjima patološki senzitiviranih nociceptora (Mense, 2004). BT-A je učinkovit u inhibiciji otpuštanja ekscitatornog neurotransmitora glutamata. U studiji provedenoj na zamorčićima, primjena BT-A smanjila je koncentraciju glutamata nakon formalinom inducirane boli (McMahon i sur., 1992). Transport TRPV1 receptora na membranu neurona također je inhibiran primjenom BT-A (Morenilla-Palao i sur., 2004). TRPV1 ionotropni receptori, kao odgovor na toplinske i proalgezijske podražaje, intenziviraju ekscitabilnost nociceptora i imaju važnu ulogu u procesuiranju upalne i periferne termalne boli. BT-A može inhibirati SNARE kompleksom posredovanu translokaciju TRPV1 receptora

---

<sup>14</sup>i.m.- intramuskularno (engl. *Intramuscular*)

na membranu neurona (Xiao i sur., 2013). U trigeminalnim ganglijima štakora, BT-A smanjuje koncentraciju CGRP-a, upalnoga neuropeptida (Durham i Cady, 2004).

Nakon formalinom inducirane upalne boli u štakora, potkožna (s.c.<sup>15</sup>) injekcija BT-A uzrokovala je smanjenje edema i upalne hiperalgezije (Cui i sur., 2004). Intratekalna injekcija (u spinalni kanal) BT-A pokazala je sličan analgetski učinak u životinjskome modelu formalinom inducirane boli (Lee i sur., 2011). Rezultati ovih pretkliničkih studija pokazuju antinociceptivni učinak BT-A. U modelu upalne boli inducirane karagenanom i kapsaicinom, pretretman s BT-A uzrokovao je smanjenje termalne i mehaničke hiperalgezije (Favre-Guilmond i sur., 2009; Bach-Rojecky i Lacković, 2005). Životinjski modeli neuropatske boli potvrdili su analgetski učinak BT-A. U modelu neuropatske boli izazvane transekcijom ishijadičnoga živca, jednokratna potkožna aplikacija BT-A smanjila je termalnu i mehaničku hiperalgezijsku (Bach-Rojecky i sur., 2005). Iako je na modelima upalne i neuropatske boli pokazano analgetsko djelovanje BT-A, uočene su određene razlike od konvencionalnih analgetika. Tako, primjerice, BT-A ne utječe na pragove boli (za razliku od morfina), već djeluje samo na patološku hiperosjetljivost. Druga je važna razlika u dugotrajnom djelovanju (nekoliko tjedana) na bol nakon jednokratne lokalne primjene. Pokazano je također da BT-A nakon primjene u spinalni kanal djeluje u nekoliko puta nižim dozama, te da učinak nastupa puno brže nego nakon lokalne s.c. primjene. To dovodi u pitanje dotadašnju hipotezu o isključivo perifernom učinku BT-A i otvara vrata ispitivanju središnjega mjesta i mehanizma djelovanja BT-A. Na nekoliko je eksperimentalnih modela pokazano da BT-A nakon lokalne primjene putuje do leđne moždine čime je dokazana teorija o njegovom središnjem mjestu djelovanja. Intraperitonealna injekcija streptozocina uzrokuje eksperimentalnu dijabetičku neuropatiju, koja je karakterizirana, između ostaloga, povećanom osjetljivošću na mehaničke i termalne podražaje. BT-A, primijenjen jednostrano s.c. u šapu štakora smanjio je mehaničku hiperosjetljivost na ipsilateralnoj strani (strana na kojoj je injiciran), ali i na suprotnoj, kontralateralnoj strani (Bach-Rojecky i sur., 2010). Nadalje, na modelu bilateralne zrcalne boli središnjega porijekla inducirane intramuskularnom primjenom fiziološke otopine pH 4, BT-A je, nakon unilateralne s.c. primjene u šapu štakora, smanjio bol na strani ozljede (strana injiciranja fiziološke otopine pH 4), ali i kontralateralno (Bach-Rojecky i Lacković, 2009). Takvo djelovanje izvan mjesta primjene, odnosno na suprotnoj strani, ne može biti rezultat samo perifernoga djelovanja, već nužno uključuje i više centre za bol.

---

<sup>15</sup>s.c.- potkožno (engl. *Subcutaneous*)

No, otvara se pitanje o transportu botulinum toksina A iz periferije prema središnjim strukturama. U opisanome modelu zrcalne boli također je pokazano da učinak BT-A na hiperosjetljivost s obje strane izostane ukoliko se inhibira mogućnost aksonalnog transporta (korišten je kolhicin kao farmakološki inhibitor aksonalnoga transporta zbog inhibicije polimerizacije mikrotubula). To dovodi do zaključka da je za transport BT-A iz periferije prema središnjim strukturama potreban retrogradni aksonalni transport. Kako bi se dodatno potvrdilo središnje mjesto djelovanja, ali i aksonalni transport korištenjem istoga modela, izvršena je transekcija distalnoga dijela ishijadičnog živca nakon proksimalne primjene BT-A s ciljem sprječavanja transporta u periferne okončine. Usprkos onemogućavanju perifernog djelovanja, BT-A je smanjio bilateralnu hiperosjetljivost. Time je na modelu bilateralne zrcalne boli središnjega porijekla po prvi puta postavljena teorija o središnjemu mjestu djelovanja BT-A na bol, nakon retrogradnoga aksonalnog transporta s periferije (Bach-Rojecky i Lacković, 2009). Nakon ove studije napravljen je niz bihevioralnih i biokemijskih eksperimenata koji su dali dokaze o središnjemu mjestu djelovanja BT-A.

U formalinskome modelu orofacijalne boli, primjena kolhicina u trigeminalne ganglije smanjila je analgetski učinak periferno primijenjenoga BT-A (u gornju usnu štakora), te je imunohistokemijski pokazana prisutnost pocijepanoga SNAP-25 (produkt proteolitičkog djelovanja BT-A) u dorzalnim rogovima ipsilateralne trigeminalne kaudalne jezgre (Matak i sur., 2011). Teoriju o aksonalnom transportu BT-A potvrđuje i imunohistokemijski nalaz pocijepanoga SNAP-25, kao indirektnog markera prisutnosti BT-A, u kontralateralnom dijelu hipokampusu nakon unilateralne primjene BT-A (Antonucci i sur., 2008). Osim u području inervacije trigeminalnim živcem, Matak i sur. (2012) imunohistokemijskom su metodom pokazali prisutnost pocijepanog SNAP-25 u ipsilateralnim segmentima leđne moždine nakon periferne intramuskularne i potkožne primjene BT-A u stražnju šapu štakora. Time je potvrđen retrogradni aksonalni transport BT-A ishijadičnim živcem, čime su dodatno potvrđeni prethodni rezultati bihevioralnih testova (Bach-Rojecky i Lacković, 2009). Intraneuralna (i.n.<sup>16</sup>) aplikacija blokatora aksonalnog transporta kolhicina spriječila je transport BT-A nakon njegove distalne intraneuralne primjene (u ishijadični živac).

Visceralna bol definira se kao bol koja potječe iz unutarnjih organa, a karakterizirana je difuznom lokalizacijom sa širenjem na somatska područja te popratnom jakom hiperalgezijom (Ness, 1999). Učinak BT-A na visceralnu bol istraživao je na modelu cistitisa (Chuang i sur.,

---

<sup>16</sup>i.n.- intraneuralno (engl. *Intraneural*)



2004) i prostatitisa (Chuang i sur., 2008). Dodatno, Drinovac i sur. (2014) ispitivali su učinak BT-A u dva modela visceralne boli na Wistar štakorima:

- 1) peritonitis nakon intraperitonealne aplikacije 1% -tne octene kiseline
- 2) kolitis nakon intrakolonske aplikacije 0.1% -tne otopine kapsaicina.

Visceralna primarna živčana vlakna ulaze u leđnu moždinu i šire se različitim segmentima te stvaraju sinaptičke veze s dubokim i površinskim ipsilateralnim i kontralateralnim neuronima dorzalnih rogova (Sugiura i Tonosaki, 1995). Posljedično, dolazi do aktivacije središnjega živčanog sustava i interakcije sa somatotopičkim strukturama, što se očituje kao precizno lokaliziran somatski impuls. Kao indikator boli korišten je pokret abdominalnog previjanja zbog bolnoga podražaja, a kao marker mehaničke osjetljivosti upotrijebljena je imunohistokemijska detekcija ekspresije c-Fos<sup>17</sup> proteina u segmentima leđne moždine štakora. Ekspresija c-Fos proteina marker je neuronalne aktivnosti prilikom prijenosa bolnog impulsa. Cilj istraživanja Drinovac i sur. (2014) bio je ispitati učinak BT-A u dva različita patofiziološka modela visceralne boli i to nakon njegove centralne primjene: intratekalno-u spinalni kanal (i.t.<sup>18</sup>) i intracisternalno-u cisternu magnu (i.c.<sup>19</sup>), što je nastavak biheviornalnih i imunohistokemijskih istraživanja središnjega mjesta djelovanja BT-A, koja su opisana prethodno u tekstu (Matak i sur., 2012; Bach-Rojecky i Lacković, 2009). BT-A je nakon intratekalne primjene smanjio broj abdominalnih grčeva uzrokovan primjenom octene kiseline, kao i sekundarnu hiperalgeziju u modelu kolitisa izazvanoga kapsaicinom. Usto je smanjen broj c-Fos pozitivnih neurona u sakralnim (S2/S3) regijama leđne moždine nakon intratekalne primjene BT-A. Intracisternalna aplikacija BT-A nije pokazala analgetski učinak, odnosno nije došlo do smanjenja c-Fos pozitivnih neurona u segmentima leđne moždine. Temeljem ovih nalaza pretpostavilo se da BT-A iskazuje analgetski učinak segmentalno, unutar struktura leđne moždine, izravno modulirajući središnju senzitivaciju i to vjerojatno inhibicijom otpuštanja ekscitatornih neurotransmitora iz središnjih završetaka primarnih aferentnih živčanih vlakana.

Coelho i sur. (2016) primijenili su BT-A intratekalno u lumbosakralno područje leđne moždine s ciljem ispitivanja učinka BT-A na neurogenu hiperaktivnost detrusora (mišić mokraćnog mjehura). Rezultatima je pokazano da intratekalno primijenjen BT-A smanjuje frekvenciju kontrakcija i stabilizira tlak u samome mokraćnom mjehuru. Pocijepani SNAP-25 predominantno je pronađen u segmentima dorzalnih rogova leđne moždine. Dodatno, u

---

<sup>17</sup>c-Fos- protein produkt c-Fos proto-onkogen (engl. *c-Fos like protein, product of c-Fos proto-oncogene*)

<sup>18</sup>i.t.- intratekalno (engl. *Intrathecal*)

<sup>19</sup>i.c.- intracisternalno (engl. *Intracisternal*)

lumbalnim segmentima (L5/L6) dorzalnih rogova leđne moždine došlo je do redukcije broja CGRP-a, što dovodi do zaključka da BT-A smanjuje neurotransmisiju neuropeptida ključnih u prijenosu bolnih impulsa na spinalnoj razini, točnije u području dorzalnih rogova leđne moždine. Budući da aferentna živčana vlakna iz mokraćnog mjehura završavaju upravo u području dorzalnih rogova leđne moždine, pretpostavlja se da BT-A primijenjen intratekalno djeluje spinalno na senzorički sustav. Ovim otkrićem potvrđuju se rezultati prijašnjih ispitivanja kojima se također ukazuje na segmentalno djelovanje BT-A na razini leđne moždine.

Drinovac i sur. (2016) dodatno su ispitali analgetski učinak BT-A u drugome modelu zrcalne boli inducirane intramuskularnom injekcijom 3%-tnoga karagenana kod Wistar štakora.

Rezultatima se trebalo odgovoriti na tri ključna problema:

- 1) mjesto djelovanja BT-A
- 2) utjecaj spinalnoga i supraspinalnoga opioidnog i GABA sustava na učinak BT-A
- 3) doprinos kapsaicin osjetljivih perifernih neurona na bilateralni antinociceptivni učinak BT-A.

Zrcalna bol, izazvana fiziološkom otopinom pH 4 (ranije opisana u tekstu) i karagenanom, primjeri su neuronalno povezane koštano-mišićne boli (Radhakrishnan i sur., 2004) koja pokazuje neke zajedničke karakteristike:

- a) mišićnu hiperalgeziju u trajanju 4-8 tjedana (Sluka i sur., 2001)
- b) sekundarnu hiperalgeziju izvan mjesta ozljede (Radhakrishnan i sur., 2004)
- c) kontralateralno širenje bolnog osjeta (Sluka i sur., 2001)
- d) izostanak aktivacije glija stanica, budući da glija inhibitori nisu učinkoviti u smanjenju boli (Ledeboer i sur., 2006).

U karagenanskom modelu uočeno je bilateralno smanjenje mehaničke hipersenzitivnosti: ipsilateralno (na strani ozljede mišića) i kontralateralno (na suprotnoj strani) nakon ipsilateralne periferne intraplantarne (i.pl.<sup>20</sup>) primjene BT-A, dok je nakon i.pl. aplikacije BT-A na suprotnoj strani od injiciranja karagenana učinak na hiperosjetljivost u potpunosti izostao. Intratekalna primjena opioidnog antagonista naloksonazina i GABA antagonista bikukulina spriječila je bilateralno analgetsko djelovanje periferno intraplantarno apliciranoga BT-A, dok primjena u moždane komore-intracerebroventrikularna (i.c.v.<sup>21</sup>) i intracisternalna primjena istih antagonista nije utjecala na bilateralni analgetski učinak BT-A. Bilateralni analgetski učinak BT-A nakon ipsilateralne intraplantarne i intratekalne primjene, a izostanak

---

<sup>20</sup>i.pl.- intraplantar (engl. *Intraplantar*)

<sup>21</sup>i.c.v.- intracerebroventrikularno (engl. *Intracerebroventricular*)

učinka nakon intracerebroventrikularne i intracisternalne primjene dodatno potvrđuje rezultate dobivene na modelu zrcalne boli uzrokovane fiziološkom otopinom pH 4 (Bach-Rojecky i Lacković, 2009). Valja napomenuti da se analgetski učinak BT-A nakon intratekalne primjene očituje pri znatno manjim dozama (1 I.U./kg - i.t.) u odnosu na ipsilateralnu intraplantarnu primjenu (5 I.U./kg - i.pl.). Analgetski učinak nakon intratekalne primjene uočen je 1 dan nakon primjene BT-A, za razliku od intraplantarne primjene kada je analgetski učinak uočen 5 dana nakon aplikacije BT-A, što dodatno ukazuje na spinalno mjesto analgetskoga djelovanja BT-A.

Na nekoliko modela boli pokazana je povezanost između GABA i opioidnog sustava u segmentima leđne moždine i središnjega djelovanja BT-A (Drinovac i sur., 2014; Drinovac i sur., 2013). Intratekalna primjena antagonista GABA sustava bikukulina te antagonista opioidnog sustava naloksonazina smanjuje analgetsko djelovanje BT-A, međutim, ako se antagonisti primijene u supraspinalne regije (i.c.v. ili i.c.) njihov učinak na analgetsko djelovanje periferno primijenjenoga BT-A izostaje. Važno je naglasiti da su bikukulin i naloksonazin aplicirani u koncentracijama u kojima ne utječu na mehaničku senzitivnost. Ovim rezultatima dodatno je potvrđeno segmentalno djelovanje BT-A nakon lokalne primjene koje uključuje interakciju sa spinalnim GABA i opioidnim inhibicijskim sustavom.

Kao što je već rečeno, aksonalni transport BT-A iz periferije u središnji živčani sustav pokazan je bihevioralnim i imunohistokemijskim eksperimentima, kao i detekcijom pocijepanoga SNAP-25 proteina u dorzalnim rogovima leđne moždine i trigeminalnoj kaudalnoj jezgri (Matak i Lacković, 2014). U području inervacije trigeminalnim živcem pokazano je da je aksonalni transport BT-A s periferije u trigeminalnu jezgru ovisan o kapsaicin osjetljivim neuronima, budući da intraganglijska primjena kapsaicina, u dozi potrebnoj za uništenje neurona, sprječava analgetsko djelovanje BT-A, što je pokazano bihevioralnim i imunohistokemijskim pokusima. Međutim, čini se da je u području inervacije ishijadičnim živcem aksonalni transport BT-A nešto drugačiji, budući da aplikacija 2%-tnoga kapsaicina direktno u ishijadični živac ne smanjuje analgetsko djelovanje periferno apliciranoga BT-A, što je dodatno potvrđeno imunohistokemijskom detekcijom pocijepanoga SNAP-25 proteina u segmentima leđne moždine. Posljedično, zaključuje se da su u aksonalni transport BT-A putem ishijadičnog živca u leđnu moždinu uključeni i drugi tipovi neurona, osim kapsaicin osjetljivih, a ne smije se odbaciti ni mogućnost razlika u transportu BT-A između trigeminalnog i ishijadičnoga područja.

## 2 OBRAZLOŽENJE TEME

Botulinum toksin tipa A našao je svoju primjenu u određenim patofiziološkim poremećajima, a broj odobrenih indikacija iz godine u godinu sve je veći. Pretklinička istraživanja pokazala su velik potencijal primjene BT-A u liječenju patofiziološki različitih bolnih stanja, međutim, za sada je BT-A odobren jedino u preventivnoj terapiji kronične migrene. Mehanizam djelovanja BT-A u živčano-mišićnim sinapsama, na čemu se temelji njegova primjena kod poremećaja hiperkontraktilnosti mišića, poznat je već nekoliko desetljeća, a uključuje inhibiciju perifernog oslobađanja neurotransmitora acetilkolina kao posljedicu specifičnoga cijepanja jednog od proteina uključenih u proces neuroegzocitoze (SNAP-25) (Aoki, 2005). Analogno tome, pretpostavljeno je da BT-A može utjecati na egzocitozu različitih neurotransmitora iz drugih, primjerice senzornih, neurona, što je najprije potvrđeno *in vitro*, a zatim i *in vivo* istraživanjima na eksperimentalnim modelima boli. U modelu formalinom izazvane boli, BT-A je pokazao analgetski učinak i smanjio pojavu edema inhibirajući oslobađanje glutamata, SP i CGRP-a na završecima neurona, čime je potvrđena teorija o perifernom mehanizmu djelovanja BT-A na upalnu bol (Cui i sur., 2004). Međutim, istraživanja koja su slijedila nakon toga, a koja su uključivala različite modele neuropatske i mišićne boli kroničnoga trajanja, otvorila su nova pitanja i pobudila sumnju u općeprihvaćenu teoriju o perifernom djelovanju. Bihevioralni rezultati, kao i naknadna imunohistokemijska potvrda proteolitičke aktivnosti BT-A (detekcija pocijepanoga SNAP-25) u središnjem živčanom sustavu pokazali su da je za dugotrajno djelovanje BT-A na patološku bol potreban njegov aksonalni transport s periferije, te da je primarno mjesto moduliranja boli leđna moždina. Najznačajniji doprinos ovoj hipotezi o središnjem analgetskom učinku BT-A dala su bihevioralna ispitivanja na modelima zrcalne bilateralne boli izazvane fiziološkom otopinom pH 4 (Bach-Rojecky i Lacković, 2009), kao i kasnija ispitivanja na modelu mišićne boli uzrokovane karagenanom (Drinovac i sur., 2016). Daljnjim istraživanjima pokazano je da analgetsko djelovanje BT-A uključuje interferenciju s GABA i opioidnim inhibicijskim sustavima, ali jedino na razini leđne moždine, odnosno segmentalno.

Premda se danas može tvrditi da je mjesto djelovanja BT-A na bol u središnjemu živčanom sustavu, o točnome mehanizmu djelovanja može se još uvijek samo nagađati. Interferencija s GABA i opioidnim sustavom jedan je od mogućih mehanizama, međutim, na koji način BT-A utječe na aktivaciju tih endogenih analgetskih putova, valja detaljnije istražiti. Drugo važno pitanje odnosi se na mogućnost transcitoze BT-A, odnosno prelaska iz jednoga neurona u

drugi, što bi pojednostavljeno značilo da BT-A nakon periferne primjene može putem neurona aksonalnim transportom doći do regija u mozgu. Odgovori na ta i mnoga druga otvorena pitanja o točnome mehanizmu djelovanja zasigurno bi potaknuli regulatorna tijela za lijekove da ubrzaju odobravanje primjene BT-A u liječenju većeg broja bolnih stanja.

S ciljem egzaktnije potvrde spinalnoga mjesta djelovanja i razjašnjenja transportnih putova BT-A, u ovome diplomskom radu imunohistokemijski se pratila i detektirala prisutnost pocijepanoga SNAP-25 proteina, kao biokemijskog dokaza prisutnosti BT-A, u lumbalnim segmentima (L4/L5) leđne moždine nakon primjene BT-A u supraspinalne regije, odnosno u cisternu magnu i moždane komore, dok je kao pozitivna kontrola služio uzorak tkiva nakon primjene BT-A u spinalni kanal. Dobiveni rezultati mogli bi potvrditi segmentalno djelovanje, ili, u drugom slučaju, ukazati na mogući transsinaptički transport BT-A.

### 3 MATERIJALI I METODE

#### 3.1 Životinje i tkivo za analizu

U ovome diplomskom radu analizirani su lumbalni (L4/L5) segmenti leđne moždine mužjaka štakora soja Wistar, prethodno tretiranih s BT-A (primijenjen je intracerebroventrikularno, intracisternalno i intratekalno). Eksperimentalni dio odrađen u sklopu rada završni je dio pokusa kojega je odobrilo Etičko povjerenstvo Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (br. 72.3-13, HR 191/02/P). Sve procedure koje su uključivale rad sa životinjama, počevši od injiciranja životinja, do žrtvovanja i uzimanja tkiva, izvodile su osobe osposobljene za rad s eksperimentalnim životinjama, sukladno Zakonu o zaštiti životinja (NN55/17). Štakori korišteni u ovom pokusu bili su stari 3 do 4 mjeseca, mase 300-400g, a uzgojeni su na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u uvjetima 12-satnih ciklusa svjetla i tame uz neograničen pristup hrani i vodi.

##### 3.1.1 Botulinum toksin

U pokusima je korišten botulinum toksin serotipa A (BOTOX<sup>®</sup>, Allergan, SAD). Dozirno pakiranje BOTOX<sup>®</sup>-a sadrži 100 internacionalnih jedinica (I.U.) pročišćenoga *Clostridium botulinum* toksina tipa A u obliku liofilizata. Jedna internacionalna jedinica odgovara količini toksina koja nakon intraperitonealne primjene uzrokuje smrt 50% miševa ( $LD_{50} = 0.048\text{ng} = 1 \text{ I.U.}$ ). Sadržaj toksina u pakiranju otopljen je u fiziološkoj otopini kako bi se dobila potrebna doza od 5 I.U./kg.

U ovom eksperimentu BT-A je injiciran u središnji živčani sustav anestetiziranih štakora na 3 različita načina:

a) intratekalno (i.t.): između spinoznih nastavaka lumbalnih L4/L5 kralješaka u spinalni kanal leđne moždine (Mestre i sur., 1994). Ispravnost primjene osigurana je promatranjem pojave pomaka repa životinje prilikom injiciranja.

b) intracisternalno (i.c.): između zatiljnoga grebena (*protuberantia occipitalis*) i atlasa direktno kroz kožu i tvrdu moždanu ovojnicu (*dura mater*) u cisternu magnu. Ispravnost primjene provjerena je ekstrakcijom male količine CSF<sup>22</sup>-a prilikom injiciranja (Nirogi i sur., 2009).

c) intracerebroventrikularno (i.c.v.): u lateralne moždane komore. Na gornjem dijelu glave načinjen je mali rez (1cm), te je izbušen (NSK Ultimate XL, Hoffman Estates, IL, SAD) otvor promjera 1mm u obje parijetalne kosti, 1.5–2mm dijagonalno od križanja sagitalnoga i koronalnog šava. Ukupna doza tvari podijeljena je ujednačke volumene (po 2.5µL) te injicirana u obje komore, na dubinu od 4mm (Noble i sur., 1967). Za primjenu malih volumena u moždane komore (ukupno 5µL) korištene su Hamilton šprice (MICROLITER syringe 10µL, Hamilton, Höchst, Njemačka). I.t. i i.c. primjena (10µL) izvedena je pomoću inzulinskih šprica s integriranim iglama promjera 27½G i volumena 0.5mL (Terumo Europe NV, Leuven, Belgija).

### 3.2 Eksperimentalni protokol za analizu tkiva

Eksperiment se sastojao od četiri skupine životinja (N=3). Tri su skupine injicirane s BT-A (5 I.U./kg) intratekalno, intracisternalno ili intracerebroventrikularno, dok je četvrtoj kontrolnoj skupini injiciran odgovarajući volumen fiziološke otopine (intratekalno). Pet dana nakon primjene BT-A/fiziološke otopine, štakori su žrtvovani radi uzimanja uzoraka tkiva leđne moždine.

Tablica 1. Prikaz eksperimentalnog protokola tretiranja ispitivanih životinja

	<b>BT-A</b>	<b>FIZIOLOŠKA OTOPINA</b>	<b>PUT PRIMJENE</b>
<b>1.SKUPINA</b>	5 I.U./kg	-	i.t.
<b>2.SKUPINA</b>	5 I.U./kg	-	i.c.
<b>3.SKUPINA</b>	5 I.U./kg	-	i.c.v.
<b>4.SKUPINA (KONTROLA)</b>	-	10 µL	i.t.

<sup>22</sup>CSF- cerebrospinalna tekućina (engl. *Cerebrospinal Fluid*)

### 3.2.1 Tkivo

Za potrebe uzimanja tkiva, štakori su žrtvovani tako što su duboko anestetizirani intraperitonealnom aplikacijom anestetika kloralhidrata (300mg/kg; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) te su podvrgnuti transkardijalnoj perfuziji fiziološkom otopinom i fiksativom (4%-tna otopina paraformaldehida u 0.01M fosfatima puferiranoj fiziološkoj otopini (engl. *phosphate buffered saline*, PBS), pH 7.4). Nakon krioprotekcije sukrozom (24h 15%-tna otopina u fiksativu, zatim 24-48h 30%-tna otopina u PBS-u) tkivo leđne moždine pohranjeno je na -80°C do korištenja (Drinovac i sur., 2013). Koristeći kriostat (CM1520, Leica Biosystems, Nussloch, Njemačka), učinjeni su rezovi (40µm) lumbalnih segmenata leđne moždine (L4/L5) i odmrznuti u 1%-tnoj otopini fosfatnoga pufera (PBS).

### 3.2.2 Kemikalije

U imunohistokemijskoj analizi korištene su sljedeće kemikalije: Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), kozji serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), kunićje primarno poliklonsko protutijelo na pocijepani SNAP-25 (proizvedeno u laboratoriju prof. Ornelle Rossetto, Sveučilište u Padovi, Italija.), medij za očuvanje fluorescencije Fluorogel<sup>®</sup> (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, SAD), kozje sekundarno anti-kunićje protutijelo Alexa Fluor 555 (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD).

### 3.3 Imunohistokemija

S ciljem detekcije i lokalizacije mogućegamjesta djelovanja BT-A, u ovom je eksperimentu metoda izbora indirektna metoda imunohistokemije, u kojoj se koristi primarno protutijelo specifično na fragment SNAP-25 proteina koji nastaje enzimskom aktivnošću BT-A. Detekcija se provodi pomoću fluorescentnog mikroskopa, pri čemu se detektira fluorescencijska aktivnost iz sekundarnoga protutijela obilježenog fluorescentnom bojom, koje se specifično veže na primarno protutijelo korišteno u eksperimentu. Uzorci lumbalnih dijelova leđne moždine (L4/L5) stavljeni su u jažice i ispirani 3 puta po 5 minuta 0.25%-tnom otopinom fosfatnoga pufera koji sadrži Triton X-100 (engl. *phosphate buffered saline-Triton*,

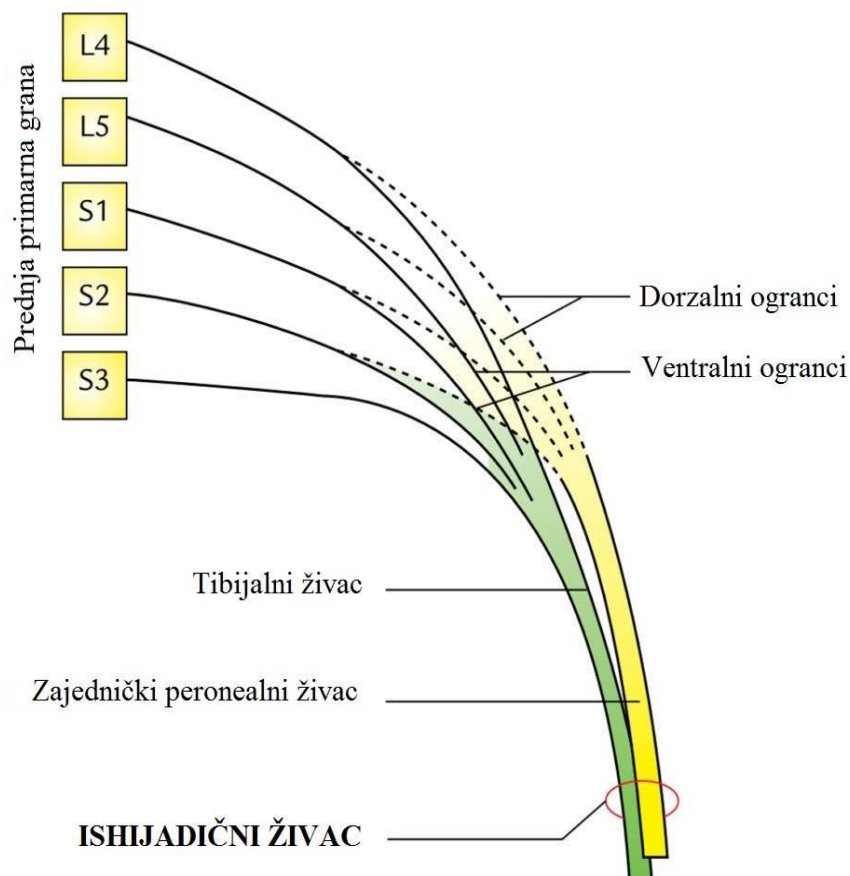


PBS-T; 100mL 1% PBS + 250 $\mu$ L Triton). Potom su uzorci blokirani 10%-tnim kozjim serumom (engl. *normal goat serum*, NGS) kako bi se spriječilo nespecifično vezanje protutijela, a zatim su inkubirani primarnim protutijelom na pocijepani SNAP-25 u 1%-tnom NGS-u (konc. 1:1500) preko noći na 4°C. Primarno protutijelo na pocijepani SNAP-25 specifično prepoznaje s BT-A pocijepani SNAP-25, što je pokazano u ranijim pokusima (Matak i sur., 2011; Antonucci i sur., 2008). Uzorci su sljedećega dana ponovno ispirani 3 puta po 5 minuta u PBS-T-u, a potom inkubirani 120 minuta sekundarnim fluorescentnim protutijelom Alexa Fluor 555 u 1%-tnom NGS-u (konc. 1:400) na tresilici, bez pristupa svjetlosti. Nakon toga, uzorci su ispirani 3 puta po 5 minuta u PBS-T-u na tresilici, bez pristupa svjetlosti, nanesen na predmetna stakalca i prekriveni medijem za očuvanje fluorescencije (Fluorogel<sup>®</sup>) te pokrovnim stakalcem. Uzorci su vizualizirani fluorescentnim mikroskopom (Olympus BX51, Olympus, Tokyo, Japan) spojenim na digitalnu kameru (Olympus DP-70, Olympus, Tokyo, Japan) i fotografirani pri povećanju 10x i 40x. Reprezentativne slike pojedine eksperimentalne skupine spojene su u programu Microsoft Paint, a svjetlina i kontrast podešeni u programu Adobe Photoshop kako bi se lakše vizualizirali pocijepani SNAP-25 proteini.

## 4 REZULTATI

### 4.1 Anatomske posebnosti leđne moždine

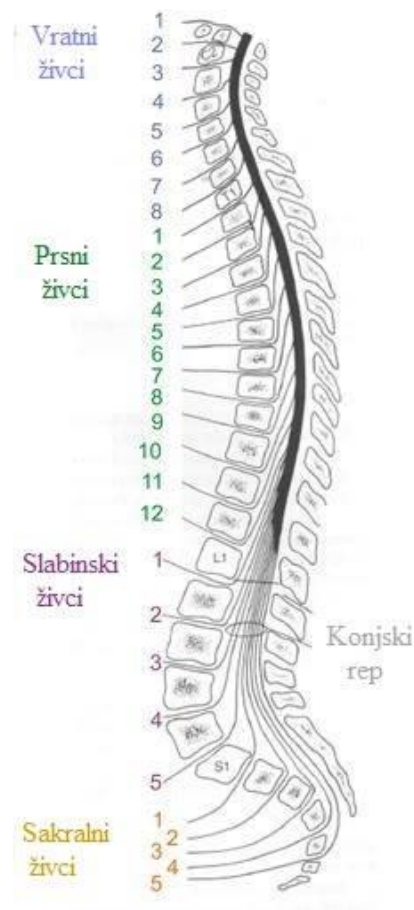
Koristeći metodu imunohistokemije, provedena je kvalitativna analiza s ciljem detekcije i usporedbe prisutnosti pocijepanog SNAP-25 u segmentima leđne moždine nakon intratekalne, u odnosu na intracisternalnu i intracerebroventrikularnu primjenu BT-A. Pristupilo se analizi L4/L5 segmenata leđne moždine, jer je poznato da upravo u tim segmentima završava inervacija senzornih živčanih vlakana ishijadičnoga živca (slika 3). Kao što je opisano u uvodnom dijelu, najviše dokaza o središnjemu segmentalnom djelovanju BT-A na bol, kao i dokaza o aksonalnom transportu dolazi iz eksperimenata na području inervacije ishijadičnoga živca.



Slika 3. Grananje ishijadičnog živca. Terminalni aferentni završeci ulaze u L4/L5 segmente leđne moždine.

(prilagođeno prema: <https://www.earthslab.com/anatomy/sciatic-nerve/>)

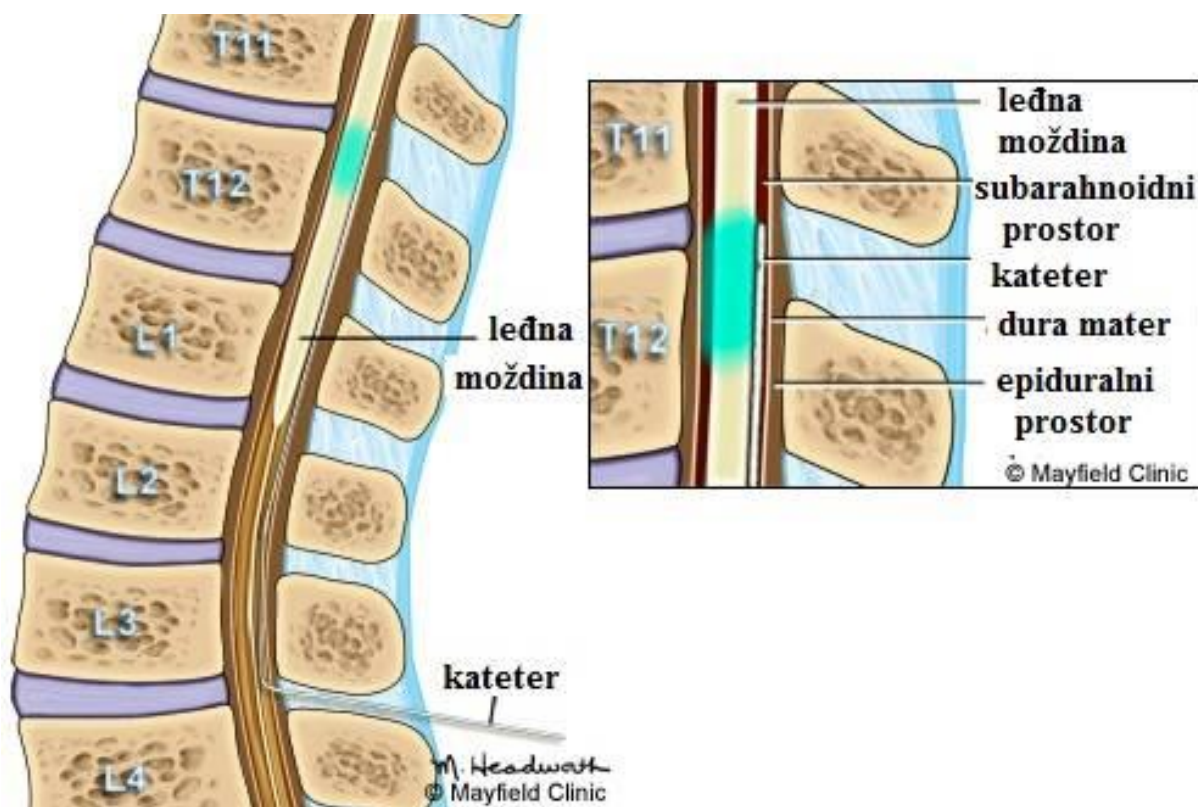
Iz leđne moždine na obje strane izlaze parni moždinski ili spinalni živci. U desnom i lijevom nizu ima ih po 31 i nose nazive odsječaka kralješnice u kojima napuštaju aksijalni skelet. Razlikuje se 8 vratnih spinalnih živaca (*nn. cervicales*), 12 prsnih ili grudnih živaca (*nn. thoracici*), 5 slabinskih ili lumbalnih živaca (*nn. lumbales*), 5 sakralnih živaca (*nn. sacrales*) i 1 trtični spinalni živac (*n. coccygeus*). Jednako se nazivaju i segmenti leđne moždine na kojima se nalaze izlazišta pojedinih živaca. Kako je leđna moždina kraća od kralješnice, segmenti su pomaknuti kranijalno u usporedbi s istoimenim kralješcima (slika 4). To vrijedi osobito za donji dio, tako da se lumbalni segmenti nalaze u visini dvaju posljednjih torakalnih kralješaka, a sakralni segmenti u visini prvoga lumbalnoga kralješka. U lumbosakralnoj regiji, korijeni živaca donjih segmenata spuštaju se unutar vertebralnoga kanala u gotovo vertikalnom snopu, tvoreći “konjski rep“ (*cauda equina*) (<http://perpetuum-lab.com.hr/>).



Slika 4. Usporedba anatomskog smještaja segmenata leđne moždine iz kojih izlaze moždinski živci u odnosu na pripadajuće kralješke.

(prilagođeno prema: Jankowska, 2013)

Leđna moždina počinje kao nastavak produžene moždine (*medulla oblongata*), kaudalnoga dijela moždanog debla, u visini donjeg ruba atlasa, a njezin je donji kraj ujedno kaudalni završetak središnjega živčanog sustava. Završava u visini prvoga ili drugoga lumbalnog kralješka, tako da zauzima samo superiorne dvije trećine vertebralnoga kanala. Budući da je leđna moždina anatomski kraća od vertebralnoga kanala, invazivni zahvati u terapijske ili dijagnostičke svrhe provode se upravo u području lumbalnih kralješaka, gdje nema opasnosti od eventualnog oštećenja same leđne moždine. Stoga je intratekalna primjena BT-A u ovom eksperimentu izvedena u razini L4/L5 kralješaka (slika 5), izravno u subarahnoidalni prostor spinalnoga kanala (https://www.novanthhealth.org/).



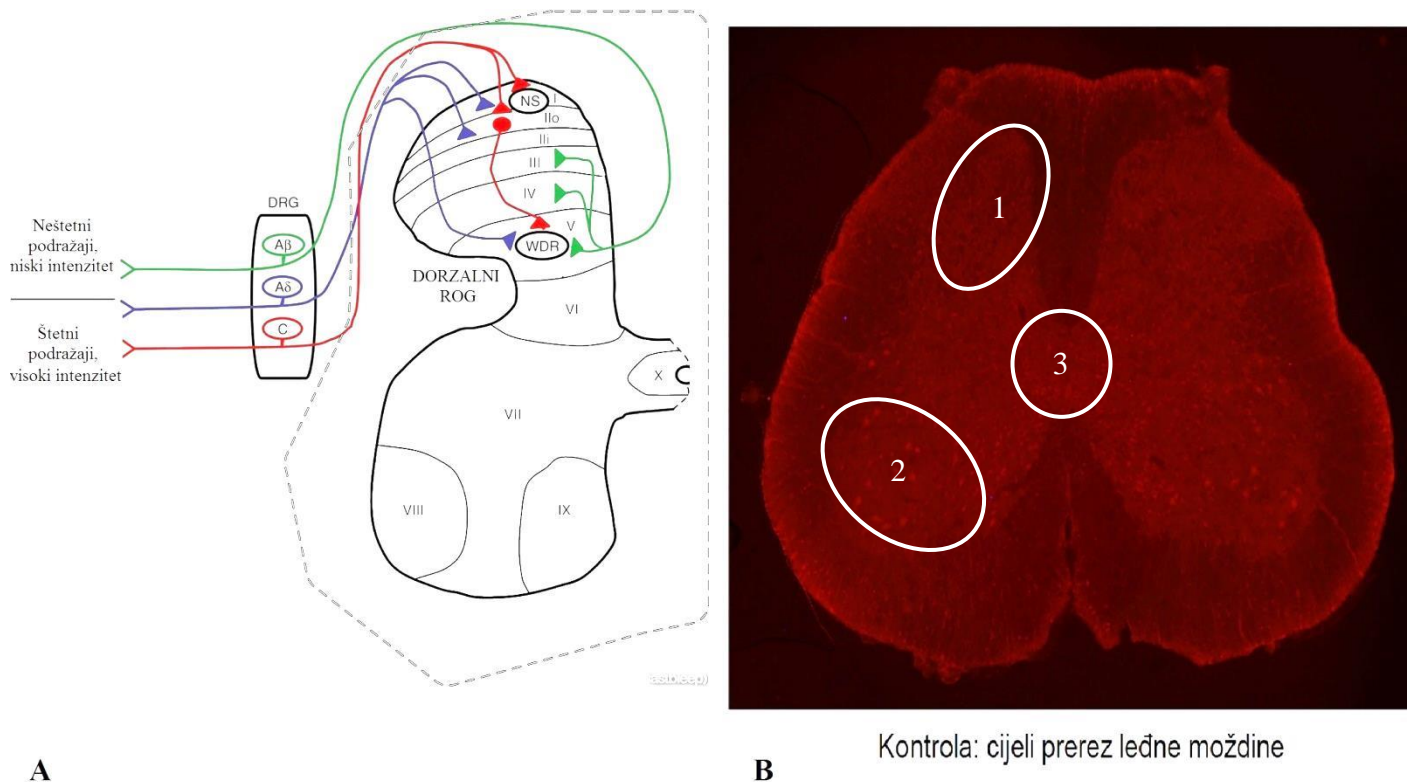
Slika 5. Prikaz spinalnog intratekalnog injiciranja. Injiciranje se vrši u razini L4/L5 kralješaka direktno u subarahnoidalni prostor spinalnog kanala ispunjen cerebrospinalnom tekućinom. (prilagođeno prema: <https://www.mayfieldclinic.com/PE-PUMP.htm>)

Bijela tvar na periferiji moždine sadrži uzlazne i silazne putove mijeliniziranih osjetnih i motoričkih živčanih vlakana koja zajedno grade spinalne živce. Središnje smještena siva tvar u obliku slova H sastoji se od tijela neurona i nemijeliniziranih vlakana. Prednji (ventralni) rogovi sive tvari sadrže donje motoričke neurone, koji primaju impulse iz motoričkoga korteksa preko silaznih kortikospinalnih putova. Aksoni ovih stanica su eferentna vlakna spinalnih živaca. Stražnji (dorzalni) rogovi sadrže osjetna vlakna koja potječu iz tijela neurona u ganglijima stražnjih korijena. Siva tvar također sadrži mnoge interneurone koji prenose motoričke, osjetne ili refleksne impulse iz dorzalnih u ventralne korijene živaca, s jedne strane moždine na drugu, ili s jedne razine moždine na drugu (<http://www.msdpriurcnici.placebo.hr/>).

Cjelokupnu sivu tvar leđne moždine moguće je sistematizirati u manje dijelove koji čine manje ili veće grupe funkcionalno srodnih neurona. Radi lakšega proučavanja sive tvari i njene funkcionalne organizacije, B. Rexed je (1952) podijelio sivu tvar leđne moždine u deset slojeva ili lamina (*laminae spinales*), koje se označavaju rimskim brojevima od I do X. U stražnjem rogu nalazi se prvih šest lamina, sedma zauzima središnju zonu, osma i deveta pripadaju prednjem rogu, a deseta obuhvaća sivu tvar oko centralnoga kanala. Primarna aferentna nocicepcijska A $\delta$  i C vlakna završavaju na neuronima smještenima u površinskim slojevima stražnjega roga, odnosno marginalnom sloju (lamina I) i želatinoznoj tvari (*substantia gelatinosa*, lamina II), te u dubljoj lamini V (Todd, 2002). U laminama III i IV nalaze se neuroni koji stvaraju sinapse s nenocicepcijskim A $\beta$  vlaknima, koja u fiziološkim uvjetima prenose osjet dodira, ali i osjet boli u patološkim uvjetima središnje senzitivacije (slika 6A) (Guyton i Hall, 2006). Stoga je u kontekstu antinociceptivnog djelovanja BT-A bilo posebno važno istražiti njegovu enzimsku aktivnost u laminama I-VI dorzalnoga roga.

## 4.2 Imunoreaktivnost pocijepanoga SNAP-25 nakon spinalne primjene BT-A

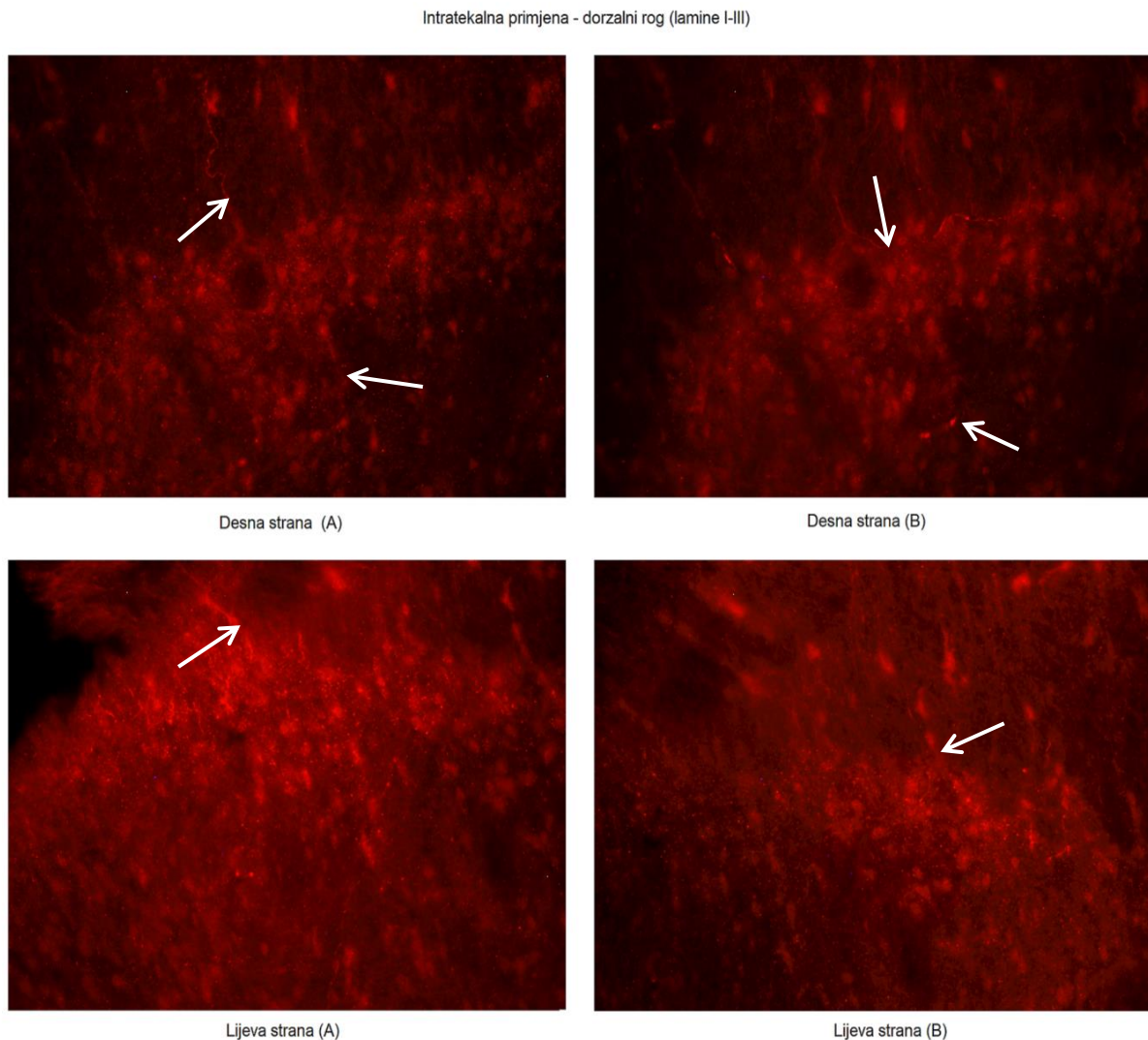
Na uzorcima L4/L5 segmenata leđne moždine kontrolnih životinja nije detektirana imunofluorescencijska aktivnost, odnosno nije dokazana prisutnost pocijepanoga SNAP-25 proteina. Uočava se karakteristična građa leđne moždine: bijela tvar izvana, a siva tvar oblika slova „H“ iznutra. Na slici 6B označeni su dijelovi sive tvari koji su analizirani u ovom ispitivanju – dorzalni rog (1), ventralni rog (2) te područje oko centralnog kanala (3).



Slika 6. Karakteristična građa sive tvari leđne moždine: A-shematski prikaz podjele regija sive tvari na lamine (prilagođeno prema: <https://www.fastbleep.com/biology-notes/39/888>); B-eksperimentalni prevez lumbalnog segmenta (L4/L5) leđne moždine. Bijelim kružnicama označeni su analizirani dijelovi sive tvari leđne moždine: 1-dorzalni rog; 2-ventralni rog; 3-prostor oko centralnog kanala.



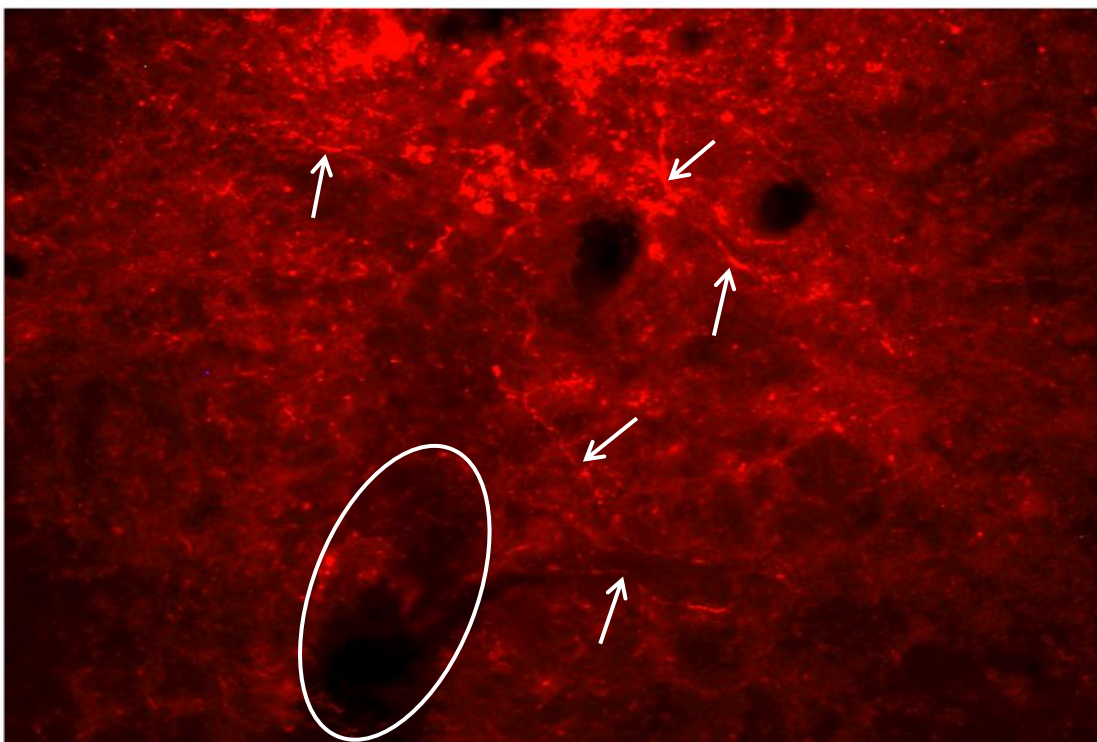
Za razliku od kontrolnih životinja, kod životinja kojima je i.t. primijenjen BT-A vidi se velik broj vlakana koja pokazuju fluorescencijsku imunoreaktivnost. Ona je posljedica vezanja sekundarnoga fluorescirajućeg protutijela na primarno protutijelo koje se pak specifično veže na pocijepani SNAP-25, produkt enzimske aktivnosti BT-A. Najveća imunoreaktivnost pocijepanoga SNAP-25 uočena je u vlaknima dorzalnih rogovia analiziranih uzoraka (slika 7). U ventralnim rogovima fluorescencijska aktivnost slabo je prisutna.



*Slika 7. Prikaz detekcije imunoreaktivnosti pocijepanog SNAP-25 u dorzalnim rogovima lumbalnih segmenata leđne moždine nakon intratekalne primjene BT-A (5 I.U./kg). Slova A i B predstavljaju prikaze identičnih regija (lijeva i desna strana dorzalnog roga), ali različitog kontrasta i fokusa postignutih pomoću pomaka mikrovijka. Bijelim strelicama označena su živčana vlakna u kojima je detektirana prisutnost pocijepanog SNAP-25 (crvena imunofluorescencija). Pocijepani SNAP-25 produkt je enzimske aktivnosti BT-A i koristi se kao indirektni marker aktivnosti BT-A.*

Kod jednoga Wistar štakora uočena je vrlo jaka detekcija pocijepanoga SNAP-25 duž vlakana difuzno proširenih po čitavoj sivoj tvari analiziranih lumbalnih segmenata (slika 8). Kasnije je utvrđeno da je uzrok tome bila pogrešno izvedena intratekalna primjena BT-A. Injekcija je aplicirana iznad razine L1 kralješka i umjesto u spinalni kanal, BT-A je injiciran izravno u tkivo leđne moždine, čime je došlo do uništenja dijela sive tvari i probitka igle sve do centralnoga kanala leđne moždine. Iako dobiveni nakon pogrešno izvedene primjene BT-A, rezultati pokazuju vrlo veliku imunoreaktivnost pocijepanoga SNAP-25 u području oko centralnoga kanala, kao i specifičnost korištenoga protutijela.

#### Područje oko centralnog kanala



*Slika 8. Prikaz imunoreaktivnosti pocijepanog SNAP-25 u području oko centralnog kanala nakon pogrešno izvedene intratekalne primjene BT-A direktno u sakralne segmente leđne moždine. Bijelom kružnicom označeno je oštećenje sive tvari leđne moždine uzrokovano injekcijskom iglom. Bijelim strelicama označen je dio vlakana u kojima je detektirana prisutnost pocijepanog SNAP-25 (crvena imunofluorescencija). Enzimska aktivnost BT-A vrlo je visoka.*

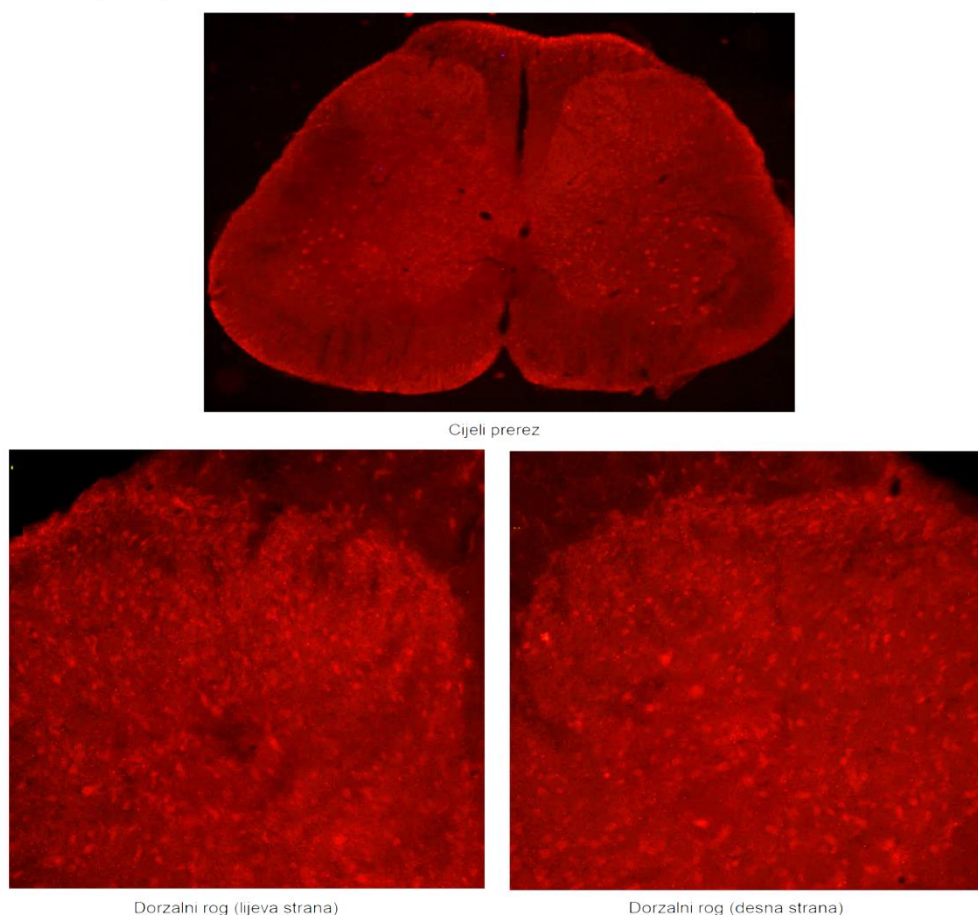


### 4.3 Imunoreaktivnost pocijepanoga SNAP-25 nakon supraspinalne primjene BT-A

Druga i treća skupina životinja supraspinalno su tretirane s BT-A (5 I.U./kg). 5 dana nakon supraspinalne i.c.v. primjene 5 I.U./kg BT-A nije uočena prisutnost pocijepanoga SNAP-25, budući da nije detektirana fluorescencijska imunoreaktivnostna analiziranim segmentima leđne moždine (slika 9).

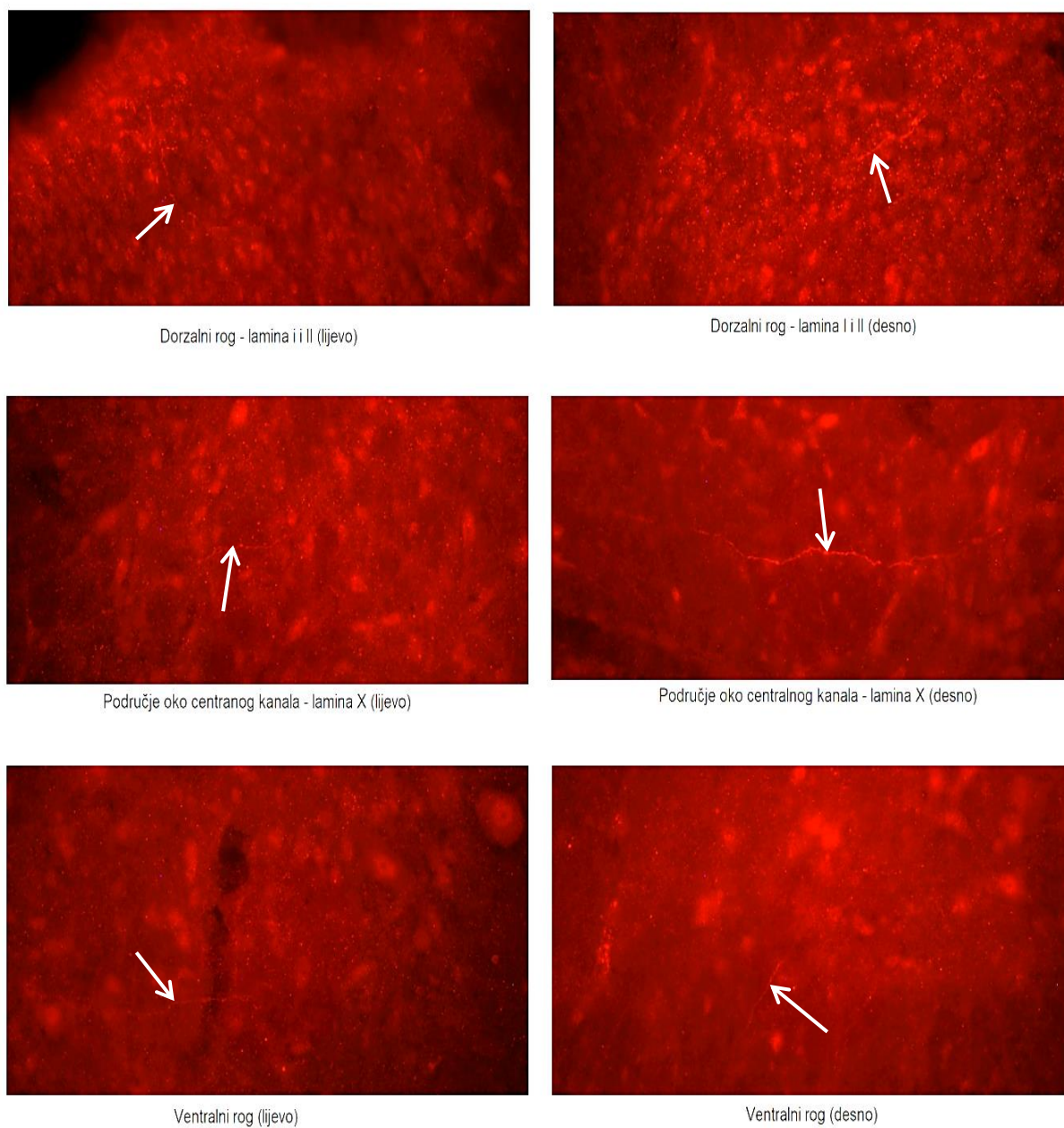
Međutim, nakon istoga vremenskog perioda fluorescencijska imunoreaktivnost pocijepanoga SNAP-25 detektirana je nakon supraspinalne i.c. primjene (slika 10). Uočena su pojedinačna SNAP-25 pozitivna vlaknau području oko centralnoga kanala i u ventralnom rogu kod uzoraka sve tri životinje. U dorzalnom rogu pocijepani SNAP-25 bio je vidljiv u malom broju vlakana na tek nekoliko uzoraka kod jedne životinje.

I.c.v. primjena



*Slika 9. Prikaz cijelog prereza (povećanje 10x) i fokusiranih (povećanje 40x) dorzalnih rogova L4/L5 segmenata leđne moždine nakon intracerebroventrikularne primjene BT-A (5 I.U./kg). Nije uočena imunoreaktivnost pocijepanog SNAP-25 niti u jednom analiziranom uzorku ispitivane skupine životinja.*

Primjena u cisternu magnu



*Slika 10. Prikaz imunoreaktivnosti pocijepanog SNAP-25 u različitim regijama sive tvari L4/L5 segmenata leđne moždine (povećanje 40x) nakon intracisternalne primjene BT-A (5 I.U./kg). Bijelim strelicama označena je imunoreaktivnost pocijepanog SNAP-25 (crvena imunofluorescencija).*

## 5 RASPRAVA

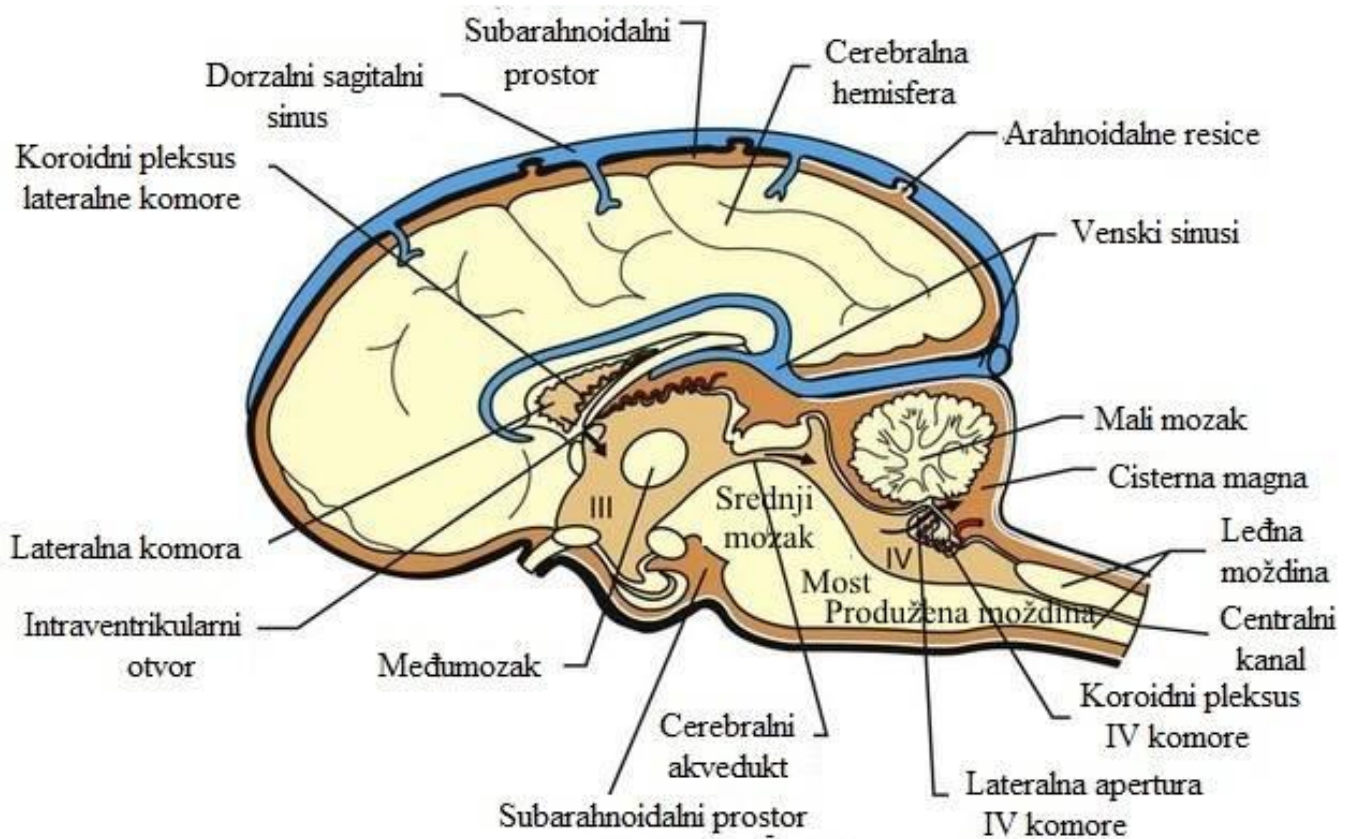
Iako se prvotno mislilo da je mehanizam djelovanja BT-A na bol perifernoga porijekla, kao posljedica inhibicije lučenja neurotransmitora iz perifernih okončina senzornih neurona te posljedičnoga smanjenja periferne senzitivacije (Aoki, 2005), serijom kasnijih eksperimenata ta je početna teorija dovedena u pitanje. Kao što je detaljno opisano u uvodnom dijelu, bihevioralnim istraživanjima na modelima upalne i neuropatske boli, a posebice na modelima bilateralne boli središnjega porijekla dani su početni dokazi o mogućem središnjem mjestu djelovanja BT-A na bol. Tim je pokusima pretpostavljeno i da BT-A s periferije dolazi do dorzalnoga roga leđne moždine retrogradnim aksonalnim transportom. Prvo su bihevioralna testiranja u modelu zrcalne boli inducirane fiziološkom otopinom pH 4 (Bach-Rojecky i Lacković, 2009), a potom i bihevioralni rezultata u modelu bilateralne zrcalne boli inducirane karagenanom (Drinovac i sur., 2016) pretpostavili središnje mjesto djelovanja BT-A, dok su imunohistokemijski dokazi postojanja pocijepanoga SNAP-25 proteina kao biomarkera BT-A dali konačnu potvrdu prisutnosti BT-A u središnjim spinalnim strukturama (dorzalni rog, na razini prve sinapse u nociceptivnom putu). U nekoliko je pokusa pokazano da BT-A smanjuje visceralnu, odnosno bilateralnu mišićnu bol samo ako se primijeni periferno (i.pl. u šapu) ili intratekalno (i.t. u spinalni kanal), dok učinak izostaje ako se injicira supraspinalno (i.c. u cisternu magnu ili i.c.v. u moždane komore). Time je pretpostavljeno segmentalno spinalno djelovanje BT-A na bol (Drinovac i sur., 2016; Drinovac i sur., 2014). Ovi su rezultati u suprotnosti s rezultatima iz samo jednoga pokusa na miševima gdje je pokazano da i.c.v. primjena BT-A smanjuje bol u formalinskom testu (Luvisetto i sur., 2006). Ova različitost može biti posljedica korištenih doza BT-A, ali i razlike među vrstama (štakor vs. miš). No, kako bi se potvrdila hipoteza o segmentalnom djelovanju, potrebni su imunohistokemijski dokazi, odnosno dokazi o prisutnosti BT-A u leđnoj moždini. Budući da zbog vrlo niskih doza (pikogramske količine) za sada nije moguće izravno detektirati niti jednom biokemijskom metodom sam BT-A (ili proteolitički aktivan dio molekule), njegova prisutnost određuje se posredno, detektiranjem proteolitičkog produkta - pocijepanoga SNAP-25 proteina. Najnovijim eksperimentima (neobjavljeni rezultati), Drinovac Vlah i sur. ispitivali su učinak BT-A na ekspresiju c-Fos pozitivnih neurona u periakveduktalnoj sivoj tvari mezencefalona nakon supraspinalne intracerebroventrikularne primjene u lateralne moždane komore u modelu upalne boli izazvane injiciranjem formalina u stražnju šapu štakora. Ekspresija c-Fos pozitivnih neurona u određenim regijama indikator je nociceptivne aktivnosti u tim

područjima, dok je periakveduktalna siva tvar mezencefalona važno mjesto u supraspinalnoj modulaciji bolnog impulsa. Pocijepani SNAP-25 detektiran je u periakveduktalnoj sivoj tvari, ali supraspinalnom primjenom BT-A nije uočeno smanjenje broja c-Fos pozitivnih neurona u toj regiji. Takvi rezultati dovode do zaključka da je moguć aksonalni transport BT-A u dalje regije mozga nakon supraspinalne primjene, ali to ipak ne utječe na bol na periferiji, čime se ponovno potvrđuje segmentalno mjesto antinociceptivnog djelovanja BT-A na razini prve sinapse u spinalnim regijama leđne moždine.

Pokusima provedenim u sklopu ovoga diplomskog rada cilj je bio ispitati mogućnost aksonalnog transporta BT-A iz supraspinalnih u spinalne regije središnjega živčanog sustava. Kao metoda izabrana je imunohistokemija, a detekcija BT-A izvršena je indirektno prateći fluorescencijsku imunoreaktivnost pocijepanoga SNAP-25. Očekivano, nakon intratekalne spinalne primjene BT-A u dozi od 5 I.U./kg, detektirana je visoka imunoreaktivnost pocijepanoga SNAP-25 u vlaknima unutar analiziranih L4/L5 lumbalnih segmenata leđne moždine. Takav rezultat samo potvrđuje dosadašnja ispitivanja i govori u prilog spinalnome mjestu djelovanja BT-A. Nakon intracerebroventrikularne primjene BT-A u lateralne moždane komore, u lumbalnim segmentima leđne moždine nije detektirana fluorescencijska aktivnost. Time se pretpostavlja da transport BT-A iz supraspinalnih u spinalne regije nije vjerojatan. No, pomalo neočekivano, nakon primjene BT-A u cisternu magnu, detektirana je slaba imunoreaktivnost pocijepanoga SNAP-25 u pojedinim vlaknima unutar lumbalnih regija leđne moždine. Ovakav rezultat otvara prostor novim istraživanjima i donekle dovodi u pitanje dosadašnje pretpostavke o nemogućnosti transporta BT-A iz mozga u lamine leđne moždine. Za pokušaj objašnjenja mogućega transporta BT-A iz prostora cisterne magne u segmente leđne moždine, treba se vratiti i pokušati razumijeti anatomske pozadine sva tri puta središnje primjene BT-A (i.t., i.c.v., i.c.). Kod sva tri načina, BT-A se injicira u prostore koji su ispunjeni cerebrospinalnom tekućinom (likvorom). Intratekalna primjena vrši se u subarahnoidalni prostor spinalnoga kanala koji je ispunjen likvorom i, pretpostavljeno, BT-A ulazi iz likvora subarahnoidalnog prostora preko bijele tvari do regija sive tvari, gdje potom modulira prijenos bolnog impulsa na razini prve sinapse. Intracerebroventrikularnom primjenom BT-A se aplicira u prostore lateralnih moždanih komora, koji su također ispunjeni likvorom i predstavljaju put protoka cerebrospinalne tekućine u druge regije mozga. Na svom putu protoka likvor, nakon prolaska kroz lateralne moždane komore, dolazi do četvrte moždane komore i prelazi kroz aperture u područje cisterne magne i potom dalje u subarahnoidalne prostore koji okružuju područje mozga i leđne moždine. Moguć je i protok cerebrospinalne tekućine direktno iz područja četvrte moždane komore u centralni kanal leđne

moždine, bez transporta preko apertura u cisternu magnu i dalje u subarahnoidalni prostor. Uzevši u obzir navedeno, moguće je da BT-A putuje iz supraspinalnih u spinalne prostore koristeći put prijenosa cerebrospinalne tekućine (slika 11). Nejasno je, međutim, zašto se nakon primjene u cisternu magnu nalazi pocijepani SNAP-25 u prerezima leđne moždine, dok se to ne primjećuje nakon intracerebroventrikularne primjene. Moguće je da odgovor opet leži u samoj anatomiji mozga. Lateralne moždane komore u koje se aplicira BT-A, nalaze se u mnogo višim dijelovima mozga, dok cisterna magna predstavlja cerebelomedularni prostor između malog mozga i produžene moždine i nalazi se anatomske na samom početku subarahnoidalnog prostora kroz koji cerebrospinalna tekućina nastavlja protok prema svim segmentima leđne moždine. Nameće se mogućnost transporta BT-A likvorom iz lateralnih moždanih komora koristeći put protoka direktno u centralni kanal leđne moždine, zaobilazeći cisternu magnu, no on je malo vjerojatan zbog vrlo maloga volumena likvora u centralnom kanalu, kao i nemogućnosti detekcije vrlo niskih koncentracija BT-A. BT-A prolazi mnogo kraći put do lumbalnih dijelova leđne moždine nakon primjene u cisternu magnu, nego nakon primjene u lateralne moždane komore, što se nastavlja na pretpostavku o transportu BT-A putem cerebrospinalne tekućine. Stoga moguće objašnjenje leži u dužini puta BT-A putem likvora, no ne može se isključiti ni mogućnost enzimske deaktivacije BT-A nakon primjene u moždane komore i tijekom transporta u spinalne regije. Samo enzimski aktivni BT-A može cijepati SNAP-25, a indirektna detekcija BT-A u lumbalnim dijelovima leđne moždine provodi se upravo putem specifičnih protutijela koja vežu isključivo pocijepani SNAP-25.





*Slika 11. Protok cerebrospinalne tekućine kroz prostore središnjeg živčanog sustava. Sekretija likvora vrši se u koroidnim pleksusima moždanih ventrikula, a zatim se tok nastavlja u dva smjera: 1- kroz cisternu magnu u subarahnoidalni prostor koji okružuje mozak i leđnu moždinu; 2- direktno iz područja IV ventrikula u centralni kanal leđne moždine.*

(prilagođeno prema: <https://veteriankey.com/cerebrospinal-fluid-and-the-blood-brain-barrier/>)

## 6 ZAKLJUČAK

Iako je BT-A odobren u velikom broju indikacija za terapijske i kozmetičke svrhe, u posljednjih je dvadesetak godina predmet interesa istraživača njegovo analgetsko djelovanje. Pokazano je na više eksperimentalnih modela upalne i neuropatske boli da BT-A nakon jednokratne periferne primjene iskazuje dugotrajan antinociceptivni učinak, što ga razlikuje od svih trenutno odobrenih analgetika. Dobro je poznato da BT-A periferno inhibira otpuštanje neurotransmitora i posljedično dovodi do desenzitizacije nociceptora na živčanim završecima, no smatra se da mehanizam analgetskog djelovanja BT-A seže u spinalne strukture središnjega živčanog sustava (SŽS). S nekoliko je pokusa pokazano da BT-A nakon periferne primjene aksonalnim transportom dolazi do dorzalnoga roga leđne moždine gdje, između ostaloga, aktivira GABA i opioidni inhibitorni sustav. Imunohistokemijska detekcija proteolitičke aktivnosti BT-A (detekcija pocijepanoga SNAP-25 proteina) u spinalnim strukturama dodatni je dokaz središnjega mjesta djelovanja BT-A na bol. Nedavnim je istraživanjima na modelu visceralne i bilateralne mišićne boli uzrokovane karagenanom pretpostavljeno da BT-A djeluje segmentalno samo ako se primijeni na razini prve sinapse. Stoga je cilj eksperimenta u sklopu ovoga diplomskog rada bio ispitati distribuciju BT-A nakon supraspinalne primjene u cisternu magnu (i.c.) i lateralne moždane komore (i.c.v.). Iako je prethodnim pokusima nakon i.c.v. primjene BT-A detektiran pocijepani SNAP-25 u periakveduktalnoj sivoj tvari koja je važna u modulaciji nocicepcije, analgetski je učinak izostao. U ovom je radu imunohistokemijskom detekcijom pocijepanoga SNAP-25 pokazano da i.c.v. primijenjen BT-A ne dolazi do dorzalnih rogova leđne moždine, dok je kod i.c. primjene nađeno nekoliko pozitivnih vlakana na razini lumbalnih segmenata. Prisutnost pocijepanoga SNAP-25 proteina detektirana je u pojedinačnim vlaknima dorzalnih rogova u tek nekoliko uzoraka samo jedne ispitivane životinje te je moguće da mala količina BT-A iz cisterne magne cirkulirajući likvorom dolazi u spinalna područja, no značenje toga nije jasno, budući da nije povezano s analgetskim djelovanjem. Očekivano, nakon intratekalne primjene, detektirana je najveća enzimaska aktivnost BT-A u vlaknima dorzalnih rogova lumbalnih segmenata leđne moždine. Iz svega navedenog može se zaključiti da BT-A očituje analgetski učinak djelujući segmentalno na razini prve sinapse u senzoričkim dijelovima leđne moždine, isključujući više centre u mozgu. Potrebna su dodatna ispitivanja kojima bi se detaljnije

utvrdila distribucija BT-A nakon primjene u različita područja SŽS-a, kao i značenje dobivenih rezultata za kliničku praksu.



## 7 LITERATURA

Antonucci F, Rossi C, Gianfrancesci L, Rossetto O, Caleo M. Long-Distance Retrograde Effects of Botulinum Neurotoxin A. *J Neurosci*, 2008, 28, 3689–3696.

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

Arnon SM, Schechter R, Inglesby TV, Henderson DA., Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Fine AD, Hauer J, Layton M, Lillibridge S, Osterholm MT, O'Toole T, Parker G, Perl TM, Philip K, Russell FK, Swerdlow DL, Tonat K, Working Group on Civilian Biodefense. Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA*, 2001, 285, 1059-1070.

Bach-Rojecky L, Šalković-Petrišić M, Lacković Z. Botulinum toxin type A reduces pain supersensitivity in experimental diabetic neuropathy: Bilateral effect after unilateral injection. *Eur J Pharmacol*, 2010, 633, 10-14.

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

Bach-Rojecky L, Dominis M, Lacković Z. Lack of antiinflammatory effects of botulinum toxin A in experimental models of inflammation. *Fund Clin Pharmacol*, 2008, 22, 503–509.

Bach-Rojecky L. Antinociceptivno djelovanje botulinum toksina tipa A. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, 2006, str. 1-27, 32.

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

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

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

Baza lijekova, 2018, dostupno na: <http://www.almp.hr/>, pristupljeno: 28.1.2018.

Bolesti kralježnične moždine, 2014, dostupno na: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/>, pristupljeno: 4.2.2018.

Botulinum toxin, 2016, dostupno na: <https://emedicine.medscape.com/>, pristupljeno: 21.1.2018.

Brian EC. Peripheral Receptor Targets for Analgesia: Novel Approaches to Pain Management. New Jersey, John, Wiley&Sons, Inc., 2009, str. 302-304.

Cai F, Adrion CB, Keller JE. Comparison of extracellular and intracellular potency of botulinum neurotoxins. *Infect Immun*, 2006, 74, 5617-24.

Carlton SM. Peripheral excitatory amino acids. *Curr Opin Pharmacol*, 2001, 1, 52-6.

Chuang YC, Yoshimura N, Huang CC, Wu M, Chiang PH, Chancellor MB. Intraprostatic botulinum toxin a injection inhibits cyclooxygenase-2 expression and suppresses prostatic pain on capsaicin induced prostatitis model in rat. *J Urol*, 2008, 180, 742–748.

Chuang YC, Yoshimura N, Huang,CC, Chiang PH, Chancellor MB. Intravesical botulinum toxin a administration produces analgesia againsta cetic acid induced bladder pain responses in rats. *J Urol*, 2004, 172, 1529–1532.

Coelho A, Oliveira R, Cruz F, Cruz CD. Impairment of sensory afferents by intrathecal administration of botulinum toxin A improves neurogenic detrusor overactivity in chronic spinal cord injured rats. *Exp Neurol*, 2016, 285, 159-166.

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

Dickerson TJ, Smith GR, Pelletier JC, Reitz AB. 8-Hydroxy quinoline and hydroxamic acid inhibitors of botulinum neurotoxin BT-A. *Curr Top Med Chem*, 2014, 14 ,2094-102.

Dressler D, Adib SF. Botulinum Toxin: Mechanisms of Action. *Eur Neurol*, 2005, 53, 3–9.

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

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

Drinovac V, Bach-Rojecky L, Lacković Z. Association of antinociceptive action of botulinum toxin type A with GABA-A receptor. *J Neural Transm*, 2014, 121, 665-669.

Drinovac V, Bach-Rojecky L, Matak I, Lacković Z. Involvement of  $\mu$ -opioid receptors in antinociceptive action of botulinum toxin type A. *Neuropharmacology*, 2013, 70, 331-337.

Durham PL, Cady R. Regulation of calcitonin gene-related peptide secretion from trigeminal nerve cells by botulinum toxin type A: implications for migraine therapy. *Headache*, 2004, 44, 35-42.

Epidural/Intrathecal/Intrapleural Analgesia, 2005, dostupno na: <https://www.novanthealth.org/>, pristupljeno: 5.2.2018.

Erbguth FJ, Naumann M. Historical aspects of botulinum toxin: Justinus Kerner (1786-1862) and the "sausage poison". *Neurology*, 1999, 53, 1850-3.

Escher CM, Paracka L, Dressler D, Kollwe K. Botulinum toxin in the management of chronic migraine: clinical evidence and experience. *Ther Adv Neurol Disord*, 2017, 10, 127–135.

Favre-Guilmond C, Auguet M, Chabrier PE. Different antinociceptive effects of botulinum toxin type A in inflammatory and peripheral polyneuropathic rat models. *Eur J Pharmacol*, 2009, 617, 48-53.

Galazka M, Soszynski D, Dmitruk K. Central Action of Botulinum Toxin Type A – Is It Possible?. *Neurophysiology*, 2015, 47.

Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*. Amsterdam, Saunders Elsevier, 2006, str. 551-588.

Hoffman RO, Helveston EM. Botulinum in the treatment of adult motility disorders. *Int Ophthalmol Clin*, 1986, 26, 241-50.

Jankovic J. Botulinum toxin in clinical practice. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2004, 75, 951–957.

Jankowska E. Spinal Interneurons. U: Pfaff D.W. (eds) *Neuroscience in the 21st Century*. New York, NY, Springer, 2013.

Kralježnična moždina, 2012, dostupno na: <http://perpetuum-lab.com.hr/>, pristupljeno: 3.2.2018.

Ledeboer A, Mahoney JH, Milligan ED, Martin D, Maier SF, Watkins LR. Spinal cord glia and interleukin-1 do not appear to mediate persistent allodynia induced by intramuscular acidic saline in rats. *J Pain*, 2006, 7, 757–767.

Lee JH, Lee SH, Song SH. Clinical effectiveness of botulinum toxin type B in the treatment of subacromial bursitis or shoulder impingement syndrome. *Clin J Pain*, 2011, 27, 523-8.

Luvisetto S, Marinelli S, Lucchetti F, Marchi F, Cobianchi S, Rossetto O et al. Botulinum neurotoxins and formalin-induced pain: central vs. peripheral effects in mice. *Brain Res*, 2006, 1082, 124-31.

Maslanka SE, Lúquez C, Dykes JK, Tepp WH, Pier CL, Pellett S, Raphael BH, Kalb SR, Barr JR, Rao A, Johnson EA. A Novel Botulinum Neurotoxin, Previously Reported as Serotype H, Has a Hybrid-Like Structure With Regions of Similarity to the Structures of Serotypes A and F and Is Neutralized With Serotype A Antitoxin. *J Infect Dis*, 2016, 213, 379-85.

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

Matak I, Rossetto O, Lacković Z. Botulinum toxin type A selectivity for certain types of pain is associated with capsaicin sensitive neurons. *Pain*, 2014, 155, 1516–1526.

Matak I, Riederer P, Lacković Z. Botulinum toxin's axonal transport from periphery to the spinal cord. *Neurochem Int*, 2012, 61, 236–239.

Matak I, Bach-Rojecky L, Filipović B, Lacković Z. Behavioral and immunohistochemical evidence for central antinociceptive activity of botulinum toxin A. *Neuroscience*, 2011, 186, 201-207.

McMahon HT, Foran P, Dolly JO, Verhage M, Wiegant VM, Nicholls DG. Tetanus toxin and botulinum toxins type A and B inhibit glutamate, gamma-aminobutyric acid, aspartate, and met-enkephalin release from synaptosomes. Clues to the locus of action. *J Biol Chem*, 1992, 267, 21338-43.

Mense S. Neurobiological basis for the use of botulinum toxin in pain therapy. *J Neurol*, 2004, 251.

Mestre C, Péliissier T, Fialip J, Wilcox G, Eschalier A. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 1994, 32, 197-200.

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

Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, García-Sanz N, Ferrer-Montiel A. Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. *J Biol Chem*, 2004, 279, 25665-72.

Ness, TJ. Models of visceral nociception. *ILARJ*, 1999, 40, 119–128.

Nigam PK, Nigam A. Botulinum toxin. *Indian J Dermatol*, 2010, 55, 8-14.

Nirogi R, Kandikere V, Mudigonda K, Bhyrapuneni G, Muddana N, Saralaya R, Benade V. A simple and rapid method to collect the cerebrospinal fluid of rats and its application for the assessment of drug penetration into the central nervous system. *J Neurosci Methods*, 2009, 178, 116-9.

Noble EP, Wurtman RJ, Axelrod J. A simple and rapid method for injecting H3-norepinephrine into the lateral ventricle of the rat brain. *Life Sci*, 1967, 6, 281–291.

Oh HM, Chung ME. Botulinum Toxin for Neuropathic Pain: A Review of the Literature. *Toxins*, 2015, 7, 3127-54.

Pain management, 2006, dostupno na: <http://www.paineurope.com/>, pristupljeno: 22.1.2018.

Prescribing information for Botox Cosmetic, 2005, dostupno na: <http://www.botox.com>, pristupljeno: 12.1.2018.

Radhakrishnan R, Bement MK, Skyba D, Sluka KA, Kehl LJ. Models of muscle pain: carrageenan model and acidic saline model. *Curr Protoc Pharmacol*, 2004, Chapter 5, Unit 5.35.

Rowland LP. Stroke, spasticity, and botulinum toxin. *N Engl J Med*, 2002, 347, 382–383.

Scott AB. Botulinum toxin injection of eye muscles to correct strabismus. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 1981, 79, 734–70.

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

Sugiura, Y, Tonosaki Y. Spinal organization of unmyelinated visceral afferent fibers in comparison with somatic afferent fibers. Seattle, IASP Press, 1995, str. 41–59.

Tarsy D, First ER. Painful cervical dystonia: clinical features and response to treatment with botulinum toxin. *Mov Disord*, 1999, 14, 1043-1045.

Todd AJ. Anatomy of primary afferents and projection neurones in the rat spinal dorsal horn with particular emphasis on substance P and the neurokinin 1 receptor. *Exp Physiol*, 2002, 87, 245-249.

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

Wise JB, Greco T. Injectable treatments for the aging face. *Facial Plast Surg*, 2006, 22, 140–6.

Xeomin, 2016, dostupno na: <http://www.xeomin.com/>, pristupljeno: 29.1.2018.

Xiao L, Cheng J, Zhuang Y, Qu W, Muir J, Liang H, Zhang D. Botulinum toxin type A reduces hyperalgesia and TRPV1 expression in rats with neuropathic pain. *Pain Med*, 2013, 14, 276-86.

## 8 SAŽETAK / SUMMARY

Botulinum toksin tipa A (BT-A) indiciran je u poremećajima prvenstveno vezanima uz povećanu spastičnost mišićnih struktura, no fokus najnovijih ispitivanja učinak je neurotoksina na bol. BT-A pokazuje iznimno povoljan farmakoterapijski profil s dugotrajnim antinociceptivnim djelovanjem i malim brojem nuspojava, što ga razlikuje od svih odobrenih analgetika. Smatralo se da BT-A iskazuje antinociceptivni učinak inhibirajući otpuštanje proupalnih medijatora na perifernim okončinama senzornih živčanih vlakana, no pozitivni rezultati u otklanjanju boli upalnoga i neuropatskog porijekla ukazuju na središnje mjesto djelovanja BT-A. Bihevioralni rezultati dobiveni modelima visceralne i zrcalne boli, u kojima je uočen bilateralni analgetski učinak BT-A nakon unilateralne periferne i intratekalne, ali ne središnje intracerebroventrikularne i intracisternalne primjene, poslužili su kao temelj hipoteze o središnjemu segmentalnom analgetskom djelovanju BT-A na spinalnoj razini. Imunohistokemijski je detektirana prisutnost pocijepanoga SNAP-25 proteina (indirektni marker aktivnosti BT-A) predominantno u dorzalnim rogovima segmenata leđne moždine, ali primjenom blokatora aksonalnog transporta prisutnost nije uočena, što pretpostavlja da BT-A nakon retrogradnog aksonalnog transporta s periferije iskazuje antinociceptivni učinak modulirajući prijenos bolnog impulsa senzornim vlaknima na razini prve sinapse u leđnoj moždini.

Ispitivano je ponašanje BT-A nakon supraspinalne primjene u lateralne moždane komore (i.c.v.) i cisternu magnu (i.c.). Iako je pocijepani SNAP-25 detektiran u daljim regijama mozga nakon i.c.v primjene BT-A, broj c-Fos (marker nociceptivne aktivnosti) pozitivnih neurona nije se smanjio. Nakon i.c. primjene BT-A uočena je prisutnost pocijepanoga SNAP-25 u pojedinim vlaknima dorzalnih rogova leđne moždine, no izostao je analgetski učinak.

Smatra se da BT-A djeluje na bol inhibicijom otpuštanja proupalnih medijatora iz okončina senzornih vlakana na razini prve sinapse u leđnoj moždini, kao i interakcijom s neurotransmisijom putem endogenog inhibitornog GABA i opioidnog sustava, što rezultira modulacijom prijenosa bolnog impulsa iz periferije prema središnjim centrima.

Botulinum toxin of Type A (BT-A) is indicated in disorders primarily connected to increased spasticity of muscular structures, but the focus of the most recent research is the effect of the neurotoxin on pain. The BT-A presents an extremely favourable pharmacotherapeutic profile with long-lasting antinociceptive action and a small number of side effects, making it different from other approved analgesics. It was deemed that the BT-A shows its antinociceptive effects by inhibiting the release of anti-inflammatory mediators at the peripheral ends of the sensor nerve fibres, but the positive outcomes in pain killing of inflammatory and neuropathic origin indicate the central place of the BT-A action. The behavioral results obtained by models of visceral and mirror pain, in which bilateral analgesic effect of the BT-A after unilateral peripheral and intracerebral, but not central intracerebroventricular and intracisternal application has been observed, have served as a foundation of the hypothesis on central segmental analgesic action of the BT-A at spinal level. Immunohistochemically, the presence of a cracked SNAP-25 protein (indirect marker of BT-A activity) has been detected, predominantly in dorsal spinous processes of the back spinal cord segments. However, by applying axonal transport blocker, no presence has been observed, assuming that the BT-A after the axonal back-transport from the periphery is showing an antinociceptive effect by modulating the transport of the painful impulse by means of sensor fibres at the first synapse level in the dorsal spine.

The behavior of BT-A after supraspinal application to lateral brain chambers (i.c.v.) and cisterna magna (i.c.) has been tested. Although the cracked SNAP-25 was detected in further regions of the brain after the i.c.v. application of the BT-A, the number of c-Fos (the nociceptive activity marker) positive neurons has not decreased. After the i.c. application of BT-A, the presence of cracked SNAP-25 in particular fibres of dorsal spinous processes of the back spinal cord has been observed, but the analgesic effect was absent.

It is deemed that the BT-A performs action against pain by inhibiting the release of anti-inflammatory mediators from the ends of sensor fibres at the first synapse level in the spinal cord, as well as interacting with the neuro-transmission by means of endogenous GABA and opioide system, resulting in modulation of the pain impulse transmission from the periphery to centres.



## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### IMUNOHISTOKEMIJSKA DETEKCIJA BOTULINUM TOKSINA U SPINALNIM REGIJAMA NAKON SUPRASPINALNE PRIMJENE

Tin Šandl

#### SAŽETAK

Botulinum toksin tipa A (BT-A) indiciran je u poremećajima prvenstveno vezanima uz povećanu spastičnost mišićnih struktura, no fokus najnovijih ispitivanja učinak je neurotoksina na bol. BT-A pokazuje iznimno povoljan farmakoterapijski profil s dugotrajnim antinociceptivnim djelovanjem i malim brojem nuspojava, što ga razlikuje od svih odobrenih analgetika. Smatralo se da BT-A iskazuje antinociceptivni učinak inhibirajući otpuštanje proupalnih medijatora na perifernim okončinama senzornih živčanih vlakana, no pozitivni rezultati u otklanjanju boli upalnoga i neuropatskog porijekla ukazuju na središnje mjesto djelovanja BT-A. Bihevioralni rezultati dobiveni modelima visceralne i zrcalne boli, u kojima je uočen bilateralni analgetski učinak BT-A nakon unilateralne periferne i intratekalne, ali ne središnje intracerebroventrikularne i intracisternalne primjene, poslužili su kao temelj hipoteze o središnjemu segmentalnom analgetskom djelovanju BT-A na spinalnoj razini. Imunohistokemijski je detektirana prisutnost pocijepanoga SNAP-25 proteina (indirektni marker aktivnosti BT-A) predominantno u dorzalnim rogovima segmenata leđne moždine, ali primjenom blokatora aksonalnog transporta prisutnost nije uočena, što pretpostavlja da BT-A nakon retrogradnog aksonalnog transporta s periferije iskazuje antinociceptivni učinak modulirajući prijenos bolnog impulsa senzornim vlaknima na razini prve sinapse u leđnoj moždini.

Ispitivano je ponašanje BT-A nakon supraspinalne primjene u lateralne moždane komore (i.c.v.) i cisternu magnu (i.c.). Iako je pocijepani SNAP-25 detektiran u daljim regijama mozga nakon i.c.v primjene BT-A, broj c-Fos (marker nociceptivne aktivnosti) pozitivnih neurona nije se smanjio. Nakon i.c. primjene BT-A uočena je prisutnost pocijepanoga SNAP-25 u pojedinim vlaknima dorzalnih rogova leđne moždine, no izostao je analgetski učinak.

Smatra se da BT-A djeluje na bol inhibicijom otpuštanja proupalnih medijatora iz okončina senzornih vlakana na razini prve sinapse u leđnoj moždini, kao i interakcijom s neurotransmisijom putem endogenog inhibitornog GABA i opioidnog sustava, što rezultira modulacijom prijenosa bolnog impulsa iz periferije prema središnjim centrima.

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

Rad sadrži: 44 stranice, 11 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 69 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: botulinum toksin, bol, SNAP-25, spinalni segmenti, supraspinalna primjena, imunohistokemija

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

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

**Dr. sc. Višnja Drinovac Vlah**, *asistentica-znanstvena novakinja Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Maja Ortner Hadžiabdić**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: travanj 2018.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### IMMUNOHISTOCHEMICAL DETECTION OF BOTULINUM TOXIN IN SPINAL AREAS AFTER SUPRASPINAL APPLICATION

**Tin Šandl**

#### SUMMARY

Botulinum toxin of Ty A (BT-A) is indicated in disorders primarily connected to increased spastics of muscular structures, but the focus of the most recent research is the effect of the neurotoxin to pain. The BT-A presents an extremely favourable pharmaco-therapeutic profile with long lasting antinociceptive action and small number of side effects, making it different from other approved analgetics. It was deemed that the BT-A shows its antinociceptive effects by inhibiting the release of anti-inflammatory mediators at the peripheral ends of the sensor nerve fibres, but the positive outcomes in pain killing of inflammatory and neuropathic origin indicate to the central place of the BT-A action. The behavioral results obtained by models of visceral and mirror pain, in which bilateral analgesic effect of the BT-A after unilateral peripheral and intraeal, but not central intracerebroventricular and intracisternal application has been observed, have served as a foundation of the hypothesis on central segmental analgesic action of the BT-A at spinal level. Immunohistochemically, the presence of a cracked SNAP-25 protein (indirect marker of BT-A activity) has been detected, predominantly in dorsal spinous processes of the back spinal cord segments. However, by applying axonal transport blocker, no presence has been observed, assuming that the BT-A after the axonal back-transport from the periphery is showing an antinociceptive effect by modulating the transport of the painful impulse by means of sensor fibres at the first synapsis level in the dorsal spine.

The behaving of BT-A after supraspinal application to lateral brain chambers (i.c.v.) and cisterna magna (i.c.) has been tested. Although the cracked SNAP-25 was detected in further regions of the brain after the i.c.v. application of the BT-a, the number of c-Fos (the nociceptive activity marker) positive neurons has not decreased. After the i.c. application of BT-A, the presence of cracked SNAP-25 in particular fibres of dorsal spinous processes of the back spinal cord has been observed, but the analgesic effect was absent.

It is deemed that the BT-A performs action against pain by inhibiting the release of anti-inflammatory mediators from the ends of sensor fibres at the first synapsis level in the spinal cord, as well as interacting with the neuro-transmission by means of endogenous GABA and opinoide system, resulting in modulation of the pain impulse transmission from the periphery to centres.

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

Thesis includes: 44 pages, 11 figures, 1 table and 69 references. Original is in Croatian language.

Keywords: botulinum toxin, pain, SNAP-25, spinal segments, supraspinal application, immunohistochemistry

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

Reviewers: **Lidija Bach-Rojecky, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Višnja Drinovac Vlah, Ph.D.** Assistant-Research Associate, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Maja Ortner Hadžiabdić, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: April 2018.