

# Antinociceptivno djelovanje botulinum toksina tipa A ovisno o mjestu primjene u središnjem živčanom sustavu

---

**Bunić, Marijana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2017**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:546813>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-31**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Marijana Bunić**

**Antinociceptivno djelovanje botulinum toksina  
tipa A ovisno o mjestu primjene u središnjem  
živčanom sustavu**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

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

*Zahvaljujem se svojoj mentorici koja mi je omogućila izvođenje ovog diplomskog rada, izv.prof.dr.sc. Lidiji Bach-Rojecky, na njenoj velikoj pruženoj pomoći, strpljenju i na svom prenesenom znanju tijekom studija. Hvala Vam na svemu što činite za nas studente!*

*Također se zahvaljujem dr.sc. Višnji Drinovac Vlah na neizmjernej pomoći u pisanju ovog rada, posebice oko obrade i tumačenja rezultata.*

*Zahvaljujem se svojim prijateljima na svim čarima studentskog života koje smo zajedno iskusili.*

*Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji na pruženoj podršci, razumijevanju i na svemu što su uložili kako bi mi omogućili uspješno školovanje.*

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Botulinum toksin .....	1
1.1.1. Botulizam .....	1
1.1.2. Struktura botulinum toksina A .....	2
1.1.3. Mehanizam djelovanja botulinum toksina A .....	3
1.1.4. Klinička primjena botulinum toksina A .....	5
1.2. Patofiziologija boli .....	7
1.2.1. Receptori za bol i nocicepcijski putovi .....	9
1.2.2. Neurotransmitori bolnog puta .....	11
1.2.3. Senzitivacija i mehanizmi nastanka .....	12
1.2.4. Modulacija nocicepcije .....	14
1.2.5. Liječenje boli .....	15
1.3. Analgetsko djelovanje BT-A .....	15
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	<b>19</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>20</b>
3.1. Životinje .....	20
3.2. Ispitivana tvar -BT-A .....	20
3.3. Eksperimentalni model boli: formalinski test i orofacijalni formalinski test .....	20
3.4. Eksperimentalni protokol .....	21
3.5. Statistička obrada rezultata .....	21
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>22</b>
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>26</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>27</b>
<b>7. SAŽETAK/ SUMMARY</b> .....	<b>33</b>

# 1.UVOD

## 1.1. Botulinum toksin

Botulinum toksin je neurotoksičan protein kojeg proizvodi anaerobna, gram-pozitivna, sporogena bakterija *Clostridium botulinum* te manje značajne *C. baratii* i *C. butyricum*. Stanište *C. botulinum* čine zemlja i morski sedimenti, a rasprostranjena je širom svijeta te može kontaminirati povrće i kolonizirati gastro-intestinalni sustav riba, ptica i sisavaca (Nantel, 2002). Botulinum toksin se smatra najpotentnijim toksinom, a njegova vrijednost LD50 u ljudi iznosi 1-3 ng/kg unošena inhalacijskim putem (Horowitz, 2005). Poznato je sedam seroloških tipova botulinum toksina: A, B, C, D, E, F i G. Ti neurotoksini su metaloproteinaze koje pokazuju specifičnu endopeptidaznu aktivnost u presinaptičkim neuronima neuromuskularne ploče (Kumar i sur., 2016). Oni svojim djelovanjem inhibiraju proces egzocitoze acetilkolina u sinaptičku pukotinu što posljedično uzrokuje mišićnu paralizu. Smatra se da svaki serotip toksina koristi različite receptore za ulazak u živčanu stanicu (Stenmark i sur., 2008). Zbog miorelaksirajućeg djelovanja, toksin danas ima kliničku primjenu u liječenju spastičnih mišićnih stanja, a također se koristi u kozmetičke svrhe. Zbog mogućnosti širenja zrakom i apsorpcije inhalacijom predstavlja potencijalno bojno oružje.

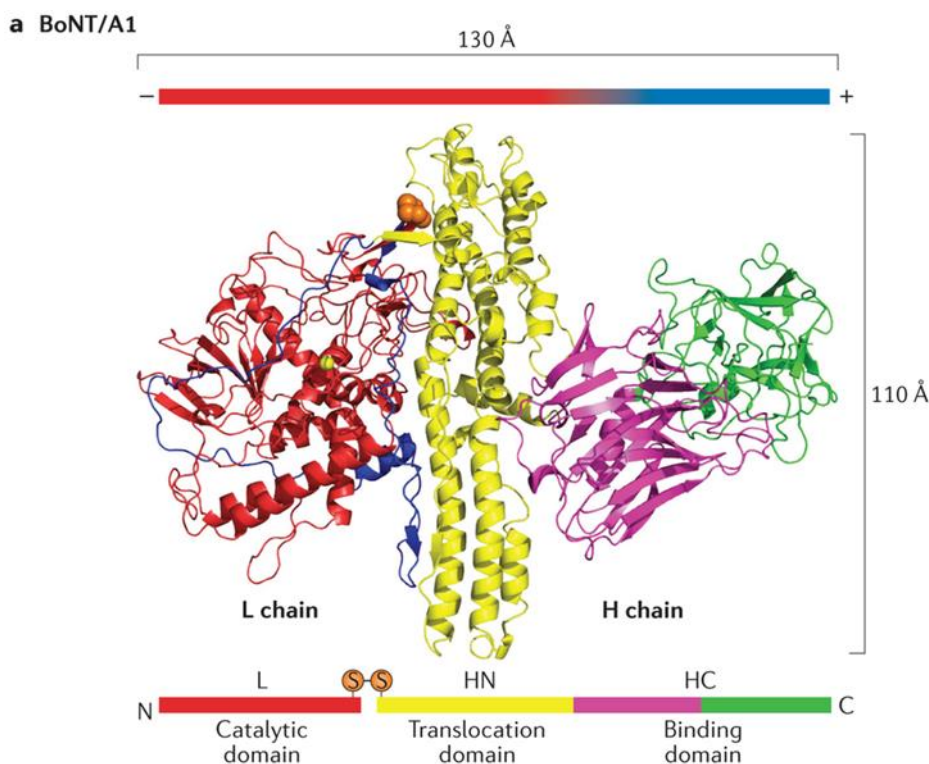
### 1.1.1. Botulizam

Botulizam karakterizira simetrična paraliza motornih i autonomnih mišića koja započinje u mišićima inerviranim kranijalnim neuronima i širi se distalno prema gornjim i donjim ekstremitetima. U ljudi su opisani slučajevi botulizma koje su izazvali sojevi *C. botulinum* koji sintetiziraju toksine -A, B i E. Do botulizma dolazi najčešće zbog ingestije hrane u kojoj se nalazi botulinum toksin, a u rjeđim slučajevima uzrok je infekcija putem rane. Kod dojenčadi, zbog manjka protektivne crijevne flore i žučnih kiselina, moguć je razvoj botulizma ingestijom spora i posljedičnom kolonizacijom intestinalnog trakta. Simptomi se obično javljaju 18-36 sati nakon ulaska toksina u organizam. U slučaju ingestije toksina početni simptomi zahvaćaju gastro-intestinalni sustav, a uključuju mučninu, povraćanje, abdominalne grčeve i dijareju. Rani neurološki simptomi su suhoća ustiju, zamućenje vida i *diplopija*, a uz njih se javlja i opstipacija. Nakon toga se javljaju *disfonija*, poremećena artikulacija govora, otežano gutanje i osjećaj slabosti u mišićima. U teškim slučajevima može doći do paralize respiratornih mišića i posljedično do respiratornog kolapsa i smrti. Liječenje

se temelji na intravenskoj primjeni antitoksina te na praćenju i održavanju ventilacije. Najčešće se primjenjuje trovalentni antitoksin koji sadrži antitijela za toksine tipa A, B i E. Također, ako je od ingestije prošlo manje od sat vremena može se provesti ispiranje želuca, a preporuča se i uzimanje aktivnog ugljena i laksativa. Neurotoksin se može detektirati u serumu 2 dana do 2 tjedna nakon nastupa simptoma. Kod trovanja ingestijom simptomi obično traju 2-8 tjedana, a prognoza najviše ovisi o kvaliteti i trajanju intenzivne njege i održavanju ventilacije jer ti faktori utječu na razvoj mogućih komplikacija kao što su respiratorne infekcije (Kumar i sur., 2016; Nantel, 2002).

### **1.1.2. Struktura botulinum toksina A**

Bakterija izlučuje botulinum toksin A (BT-A) u obliku velikog proteinskog kompleksa veličine do 900 kDa. On se sastoji od biološki aktivne komponente, veličine 150 kDa, a ostatak čine enzimski neaktivni proteini. To su netoksični neurotoksinu-pridruženi proteini (NAP; engl., *neurotoxin-associated proteins*) koji utječu na stabilnost kompleksa i štite toksin od proteolize i denaturacije u kiselim uvjetima gastrointestinalnog trakta te olakšavaju transport iz gastrointestinalnog trakta do neurona (Gu i Jin, 2013; Chen i sur, 1998). Biološki aktivna komponenta se sintetizira u obliku propeptidnog lanca koji se u post-translacijskoj modifikaciji cijepa na teški (~100kDa) i laki (~50 kDa) lanac koji se povezuju disulfidnom vezom čineći dvolančanu molekulu koja se sastoji od 1,285 aminokiselina (Oguma i sur., 1994). Trodimenzionalnu strukturu čine tri domene veličine ~50 kDa koje omogućuju biološku aktivnost (Slika 1). N-terminalna domena lakog lanca je o cinku ovisna endoproteaza, dok se na N-kraju teškog lanca nalazi domena za translokaciju, a na C-kraju teškog lanca je domena kojom se toksin veže na receptore stanične površine (Kumar i sur., 2016; Gu i Jin, 2013; Lacy i sur., 1998).



Slika 1. Struktura botulinum toksina tipa A (preuzeto s: Rosetto i sur., 2014).

### 1.1.3. Mehanizam djelovanja botulinum toksina

BT-A nakon ingestije ulazi u krvotok gdje dolazi do disocijacije proteinskog ne-toksičnog dijela, a biološki aktivan toksin putuje do kolinergičnih živčanih završetaka. Točan mehanizam djelovanja nije u potpunosti razjašnjen, ali eksperimentalni podaci upućuju da se radi o procesu koji se odvija u 3 koraka (Tige i Schiavo, 2013). Prvi korak uključuje specifično vezanje domene teškog lanca neurotoksina visokim afinitetom na površinske receptore presinaptičkih živčanih završetaka. Prihvaćen je model dualnog receptora gdje se receptor-vezujuća domena prvo veže s koreceptorima koje čine membranski polisijalogangliozidi, posebice G1b vrste, koji su uglavnom prisutni u neuronima. Tim vezanjem nastaje kompleks koji se pomiče do specifičnog receptora kojeg čini sinaptički vezikularni glikoprotein 2C (SV2C). SV2C je također eksprimiran na površini stanica crijeva, ali je vezanje neurotoksina puno slabije. Smatra se da je tome uzrok manji afinitet ili manji broj receptora u crijevima (Kumar i sur., 2016).

Nakon vezanja na receptor dolazi do internalizacije pomoću endocitoze posredovane receptorom. U endosomu zbog niskog pH dolazi do cijepanja disulfidne veze i do

konformacijske promjene u strukturi. Translocirajuća domena teškog lanca se ugrađuje u membranu vezikule i formira transmembranski kanal pomoću kojeg se laki lanac translocira u citosol gdje ostvaruje svoju metaloproteinaznu aktivnost, specifično cijepajući 9 aminokiselina s C kraja proteina SNAP-25 (engl., *synaptosome-associated protein of 25 kDa*) koji zajedno sa sintaksinom-2 i sintaksinom čini SNARE kompleks (engl., *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor NSF associated protein receptor*) koji je nužan za vezikularni transport i egzocitozu neurotransmitora iz presinaptičkih živčanih završetaka (Dolly i Aoki, 2006). Cijepanjem SNAP-25 onemogućeno je formiranje funkcionalnog SNARE kompleksa te je onemogućena fuzija vezikule s membranom neurona i posljedično egzocitoza acetilkolina u sinaptičku pukotinu. Djelovanje botulinum toksina na neuromuskulatornu vezu se očituje kao dugotrajna, ali potpuno reverzibilna mišićna paraliza koja ne dovodi do degeneracije neurona. Jačina djelovanja je ovisna o dozi, a paralitičko djelovanje kod intramuskularne primjene zamijećeno je 2-3 dana nakon aplikacije, a maksimalan učinak postiže nakon dva tjedna koji ostaje stalan sve do 2,5 mjeseci kada se postepeno smanjuje (Kumar i sur., 2016). Trajanje djelovanja u mišićnom tkivu je 4-6 mjeseci (Dressler i Benecke, 2007). Smatra se da je glavni uzrok dugotrajnosti paralize stabilnost proteazne aktivnosti toksina. U eksperimentu u kojem su kromafinske stanice bile izložene botulinum toksinu zamijećena je povećana ekspresija gena koji kodira SNAP-25, ali bez zamijećene egzocitoze što upućuje na trajnu unutarstaničnu proteaznu aktivnost toksina. Također, pocijepani SNAP-25 je veoma stabilan i zadržava se dugo u neuronu, a pokazuje antagonističko djelovanje prema cjelovitom i funkcionalnom SNAP-25 (Dolly i Aoki, 2006).

Na eksperimentalnom modelu zamijećeno je da se proces vraćanja funkcije živčanim završecima kolinergičkih neurona nakon primjene BT-A odvija na 2 načina. U inicijalnoj fazi iz zahvaćenog neurona započinje nicanje novih ogranaka te se stvaraju nove sinapse što omogućuje mišićnu kontrakciju koja je zamijećena 28 dana nakon početka djelovanja toksina. Smatra se da u procesu nastanka novih ogranaka sudjeluju okolne Schwannove stanice te inaktivna mišićna vlakna paraliziranog mišića koje izlučuju potrebne faktore rasta i druge signalne molekule (Tam i Gordon, 2003). U drugoj fazi zahvaćeni neuron postepeno postaje funkcionalan te je omogućena egzocitoza neurotransmitora iz presinaptičkih okončina, a istovremeno dolazi do prestanka aktivnosti ogranaka i njihovog propadanja. Za potpuni oporavak funkcije presinaptičkih neurona u motornoj ploči potrebno je oko 90 dana. Osim što djeluje na presinaptičke završetke motornih neurona, botulinum toksin utječe i na izlučivanje acetilkolina iz parasimpatičkih neurona koji inerviraju glatku muskulaturu i egzokrine žlijezde



kao što su slinovnice, znojnice i lakrimalne žlijezde gdje zamijećeni učinak traje 6-9 mjeseci (Kumar i sur., 2016; Tighe i Schiavo, 2013). Također je zamijećen učinak na nocicepciju i prijenos bolnih signala što se smatra da je posljedica djelovanja toksina na egzocitozu neurotransmitora uključenih u modulaciju nocicepcije, poput glutamata, supstancije P, CGRP-a<sup>1</sup> i nordadrenalina (Kim i sur., 2015).

#### **1.1.4. Klinička primjena BT-A**

Dugotrajno i lokalizirano djelovanje na mjestu primjene čine botulinum toksin veoma korisnom farmakološkom tvari. Njegova klinička primjena je započela 1989. kada ga je Američka agencija za hranu i lijekove (FDA; engl., *Food and Drug Administration*) odobrila za liječenje strabizma i blefarospazma pod nazivom „Oculinum“. Indikacije za uporabu su se do danas proširile na razne oblike distonija i spastičnih stanja glatke i skeletne muskulature, te na hipersekreciju žlijezda. Također ima i široku primjenu izvan odobrenih indikacija („off-label“) gdje se koristi u stanjima kao što su: kronična bol u donjem dijelu leđa, traumatske ozljede glave, cerebralna paraliza, akalazija (Bomba-Warczak, 2016; Erbguth, 2008). Najpoznatija je uporaba botulinum toksina u estetske svrhe, gdje se koristi od ranih devedesetih godina te predstavlja jedan od najpoznatijih kozmetičkih zahvata, najčešće za tretiranje bora i asimetrije lica (Carruthers, 2002). Novija istraživanja upućuju na njegovu sve veću kliničku značajnost budući da ima brojne prednosti, a manje nedostatke u odnosu na klasičnu terapiju (Tablica 1). Prema izvješću kompanije Allergan (proizvođač Botox<sup>®</sup>-a) iz 2013., više od polovice pacijenata na godišnjoj razini primilo je injekcije toksina u medicinske umjesto u estetske svrhe (Bomba-Warczak, 2016).

---

<sup>1</sup> calcitonine gene-related peptide

Tablica 1. Prednosti i nedostaci uporabe BT-A kod tretiranja stanja karakteriziranih mišićnom hiperaktivnošću (modificirano prema Elovic i sur, 2009).

Prednosti	Nedostaci
Postoje dokazi o učinkovitosti iz dvostruko-slijepih, placebo kontroliranih studija	Veći trošak u odnosu na standardnu terapiju
Utjecaj na mišiće je reverzibilna	Moguć razvoj rezistencije
Potencijalno smanjuje bol	Moguće nuspojave uključuju umor i glavobolju
Učinkovit u području guste osjetilne inervacije	Postoji rizik za razvoj učinaka u području distalno od injiciranja
Dobra suradljivost pacijenata	Relativne kontraindikacije kod neuromuskularnih bolesti

U terapijske svrhe se koriste serotipovi A i B, dok se moguća klinička upotreba toksina C, E i F još istražuje. Pripravci botulinum toksin A se nalazi na tržištu u liofiliziranom obliku pod nazivima Botox<sup>®</sup> i Dysport<sup>®</sup> gdje se toksin nalazi u obliku kompleksa sa ne-toksičnim proteinima, te Xeomin<sup>®</sup> u kojem se toksin nalazi u obliku monomernog peptida bez kompleksirajućih proteina. Serotip B se nalazi na tržištu pod nazivom NeuroBloc<sup>®</sup>/Myoblock<sup>®</sup> te dolazi u obliku otopine, pa se može koristiti bez prethodne obrade, ali zbog održavanja stabilnosti potreban je nizak pH što kod polovice pacijenta tijekom primjene izaziva intenzivnu bol. Pripravci se međusobno razlikuju po jačini biološke aktivnosti koja se izražava u internacionalnim jedinicama. Jedna jedinica odgovara količini toksina koja ubije 50% ženskih miševa teških 18-20 g. Pripravci se razlikuju međusobno po jedinicama pa tako jedna jedinica Botoxa<sup>®</sup> odgovara 0,048 pg toksina (Bach-Rojecky, 2006).

Pripravci BT-A imaju sličan blagi profil nuspojava, a čiji intenzitet i dužina trajanja ovise o primjenjenoj dozi. Najčešće se javljaju bol, oteklina, crvenilo i prolazna utrnulost na mjestu primjene, glavobolja, malaksalost i mučnina te pretjerana slabost u obližnjim mišića. Pripravci BT-B dodatno pokazuju i nuspojave koje zahvaćuju autonomni živčani sustav već i u niskoj dozi, a očituju se kao suhoća usta, iritacija rožnice, nosne i usne sluznice. Kod nekih pacijenata je došlo do razvoja neutralizirajućih antitijela prema BT i rezistentnosti na terapiju. Smatra se da rizik povećava veća količina primjenjenog toksina (200 jedinica u jednoj

aplikaciji) te ponovljena primjena unutar mjesec dana, ali potrebna su daljnja istraživanja na tom području (Wheeler i Smith, 2013).

## **1.2. Patofiziologija boli**

Bol je kompleksan fenomen koji nema jedinstvenu definiciju. Međunarodno udruženje za istraživanje boli (IASP)<sup>2</sup> definira bol kao neugodan osjetilni i emocionalni doživljaj koji je povezan sa stvarnom ili potencijalnom ozljedom tkiva, a također ima kognitivnu komponentu. Bol je rezultat složenog procesa koji započinje interakcijom štetnog podražaja i receptorima na mjestu ozljede, što rezultira signalom koji se perifernim neuronima prenosi u središnji živčani sustav gdje dolazi do obrade signala i nastanka osjeta te posljedično do refleksne reakcije na taj podražaj (Bosnar Puretić i Demarin, 2012). Evolucijska uloga boli je upozoriti organizam na štetni podražaj te izbjegavanje ili smanjivanje oštećenja. Taj proces možemo podijeliti u 4 faze: transdukcija (registriranje podražaja), transmisija (prijenos signala), modulacija (obrada signala) i percepcija (svjesno doživljavanje boli) (Persoli-Gudelj i sur., 2016). Kako će pojedinac doživjeti bol ne ovisi samo o vrsti i intenzitetu podražaja nego i o raznim čimbenicima kao što su prijašnja iskustva, iščekivanje, strah, spol te sociološki i kulturni aspekti koji mogu osjet boli pojačati ili smanjiti, što čini bol multidimenzionalnim i izrazito subjektivnim fenomenom. Bol djeluje na organizam kao stresni čimbenik pri čemu dolazi do pojačanog lučenja kortizola i kateholamina što rezultira povećanjem krvnog tlaka, pojačanom respiracijom i ubrzanjem pulsa te suprimiranjem imunološkog sustava i sveukupno negativnim utjecajem na organizam, pri čemu adekvatna i pravovremena analgezija ima povoljan učinak (Persoli-Gudelj i Lončarić-Katuškin, 2015). Da bi se bolje procijenilo bolno stanje te odredila odgovarajuća terapija izrađene su razne klasifikacije boli (Woolf i sur., 1998). Neki od načina podjele su:

- a) Na temelju anatomije, odnosno dijelu tijela koje zahvaća. To su primjerice: bol u donjem dijelu leđa, glavobolje, bolovi u zdjelici, zubobolje..
- b) Ovisno o duljini trajanja postoji akutna i kronična bol. Akutna bol je povezana s bolnim podražajem relativno kratkog trajanja te prestaje zajedno s bolnim podražajem ili nestaje postupno sa zacjeljivanjem. Kronična bol je prisutna dulji vremenski period (više od 3 mjeseca) te je povezana s dugotrajnim i/ili progresivnim bolestima kao što su karcinomi i kronične upale ili medicinskim stanjima kao što su amputacija i herpes zoster. Za razliku od akutne boli koja uglavnom ima zaštitnu ulogu, kronična bol nema

---

<sup>2</sup> International Association for the Study of Pain

evolucijsku funkciju te možemo reći da je ona je sama po sebi bolest koja ima negativan utjecaj na fizičko i mentalno zdravlje te na kvalitetu života (Demarin, 2013).

- c) Ovisno o mehanizmu nastanka razlikujemo nociceptivnu, neuropatsku i upalnu:

Nociceptivna bol nastaje djelovanjem štetnog podražaja visokog intenziteta na perifernim receptorima za bol pri čemu se izlučuju kemijski prijenosnici. Njena uloga je rano upozorenje na moguće oštećenje tkiva.

Neuropatska bol nastaje zbog ozljeda ili bolesti perifernog i/ili središnjeg somatosenzornog sustav, pri čemu dolazi do povećane ekscitabilnosti neurona. Javljaju se simptomi kao što su *paroksizmalna* i površna bol te parestezije. U pozadini je mehanizam nastanka koji se temelji na patološkim promjenama na periferiji, kralježničkoj moždini i mozgu.

Upalna bol nastaje djelovanjem proupalnih medijatora koji se izlučuju iz okolnih stanica (npr. leukociti, stanice endotela, fibroblasti, trombociti i mastociti) na periferne receptore za bol pri čemu dolazi do njihove aktivacije i senzitivacije. Bolni impulsi se prenose, osim u kralježničnu moždinu, i u kolateralne aksonske ogranke iz kojih se luče tvari kao što su supstancija P, koja uzrokuje vazodilataciju, i CGRP-a, koji povećava propusnost kapilara. U razvoju upalne boli sudjeluju i „tihu“ ili „spavajući“ C-nociceptori koji u fiziološkim uvjetima ne reagiraju na štetne podražaje. Djelovanjem proinflammatory medijatora dolazi do njihove senzitivacije i aktivacije podražajima niskog i visokog intenziteta. Za upalnu i neuropatsku bol karakteristične su pojave, osim fenomena senzitivacije, i hiperalgezija i alodinija o kojima će više riječi biti kasnije. Često su bolni sindromi rezultat kompleksnih interakcija različitih patofizioloških mehanizama. Primjerice, u malignoj boli i karpalnom sindromu se radi o kombinaciji nociceptivnih, upalnih i neuropatskih mehanizama (Barada, 2014; Dobrila-Dintinjana i sur., 2012; Morović-Vergles, 2007; Bach-Rojecky, 2006).

- d) Ovisno o porijeklu dijeli se na mišićnu, visceralnu, kutanu...

- e) Ovisno o jačini ona može biti blaga, umjerena ili intenzivna. Često se u procjeni koristi vizualno-analogni skala od 0 do 10, gdje 10 označava najjaču moguću bol (Crichton, 2001).

### 1.2.1. Receptori za bol i nocicepcijski putovi

Receptori za bol ili nociceptori, su slobodni živčani završeci perifernih osjetnih vlakana koji obliku mogu biti razgranati ili pak tvore neučahurene klupčaste tvorbe (Morović-Vergles, 2007). Njihova membrana sadrži ionske kanale koji se otvaraju djelovanjem štetnih toplinskih i mehaničkih podražaja ili pak kemijskim ligandima pri čemu dolazi do ulaska  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  u stanicu što uzrokuje depolarizaciju mebrane. Ako je promjena membranskog potencijala dovoljno velika, dolazi do otvaranja naponom reguliranih  $\text{Na}^+$  kanala i nastaje akcijski potencijal koji odražava intenzitet i trajanje štetnog podražaja. Nociceptori se nalaze gusto raspoređeni u površinskim slojevima kože, mišićima, zglobnim površinama, stijenakama arterija, falksu i tentoriju u lubanji, dok se u unutarnjim organima nalaze u manjem broju. (Guyton i Hall, 2016; Gold i Gebhart, 2010). Istraživanjima je pokazana prisutnost nociceptora u svim dijelovima kostiju, pa se osim u pokosnici, nociceptori nalaze i u koštanoj srži i mineralnom dijelu kosti (Morović-Vergles, 2007). Za razliku od većine ostalih osjetnih receptora kod kojih trajanjem podražaja dolazi do osjetne adaptacije, nociceptori se slabo ili nikako ne adaptiraju. Naprotiv, u određenim uvjetima može doći do pojačanog odgovora na štetni podražaj (Guyton i Hall, 2016).

Ovisno o vrsti bolnog podražaja na koji reagiraju, nociceptori se dijele na:

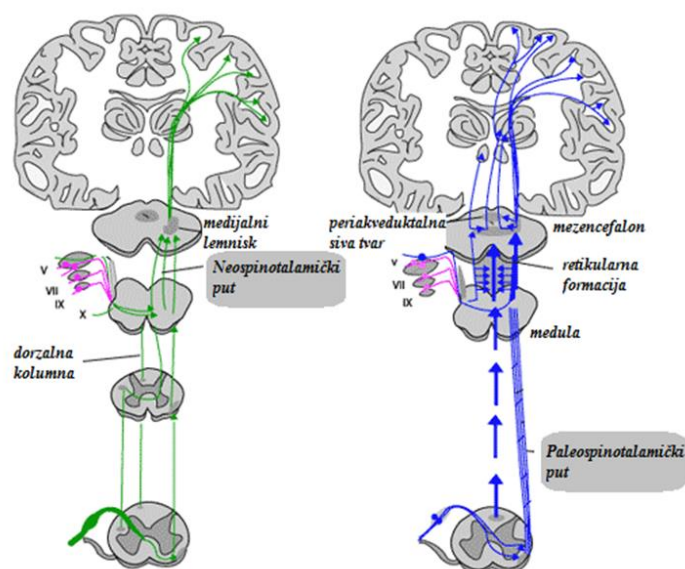
- a)  $A\delta$ -mehaničko-toplinske koji reagiraju na intenzivnu mehaničku ili toplinsku stimulaciju.  $A\delta$  nociceptori se još dijele na tip I i II ovisno o odgovoru na toplinski podražaj. Nociceptori tipa I reagiraju na mehaničke podražaje i pokazuju relativno visok prag za kratkotrajni toplinski podražaj, dok im se kod dugotrajne toplinske stimulacije prag snižuje. Nociceptori tipa II imaju relativno nizak prag za kratkotrajni toplinski podražaj te se brzo adaptiraju, a većina posjeduje veoma visoki prag za mehaničke podražaje.
- b) C-polimodalne koji reagiraju na štetne toplinske, kemijske i mehaničke podražaje.

Za razliku od ostalih mehanoreceptora i termoreceptora, nociceptore aktiviraju samo intenzivni podražaji, ali u slučajevima oštećenja tkiva ili živaca dolazi do njihove senzitivacije što rezultira sniženjem praga podražljivosti (Basbaum i sur., 2009; Bach-Rojecky, 2006).

Bolni impulsi se iz  $A\delta$ -nociceptora prevode mijeliniziranim  $A\delta$ - aferentnim vlaknima. Vlakna tipa I provode impulse srednjom brzinom  $25 \text{ ms}^{-1}$ , a tip II brzinom oko  $15 \text{ ms}^{-1}$ . Takva bol se opisuje kao lokalizirana i oštra, a nastaje primjerice kod uboda igle, porezotina nožem i akutnih opekline. Impulsi se iz polimodlanih receptora prenose nemijeliniziranim C vlaknima,

čija je brzina provođenja u rasponu od 0,5-1,2 ms<sup>-1</sup>, a bol koja se javlja se opisuje kao tupa, žareća, pulsirajuća i slabo lokalizirana. Zbog različitog načina i brzine prijenosa impulsa često bolni podražaj karakterizira osjećaj „dvostruke“ boli. 0,1 sekundi nakon bolnog podražaja prvo se javlja brza i oštra bol visokog intenziteta, koju provode mijelinizirana A $\delta$ -vlakna, a zatim se, nakon minutu ili više, javlja tupa bol slabijeg intenziteta koja se pojačava s vremenom, a provode je nemijelinizirana C vlakna (Guyton i Hall, 2016; Basbaum i sur., 2009; Ringkamp i Meyer, 2008; Bach-Rojecky, 2006).

Impulsi se prenose prema SŽS primarnim aferentnim aksonima (periferne grane) čija se tijela nalaze u ganglijima dorzalnih korjenova, a tijela onih koji prenose signale iz područja lica se nalaze u trigeminalnom gangliju (Basbaum i sur., 2009). Središnjom granom primarnih aferentnih živaca impulsi dolaze u dorzalni rog kralježnične moždine koja je podijeljena na nekoliko Rexedovih lamina, ovisno o veličini i obliku te rasporedu i gustoći neurona. U kralježničnoj moždini bolni impulsi se prenose do mozga neospinotalamičnim ili paleospinotalamičnim putem ovisno o vrsti vlakna (slika 2), (Puljak i Sapunar, 2014; Bach-Rojecky 2006). Neospinotalamičnim traktom se prenose brzi bolni signali A $\delta$ -vlaknima koja završavaju uglavnom u lamini I i pobuđuju neurone drugog reda čija vlakna prelaze na suprotnu stranu kralježnične moždine kroz prednju komisuru i dolaze do mozga anterolateralnim kolumnama. Dio vlakana završava u retikularnom području moždanog debla, a većina završava u ventroposterolateralnim talamičkim jezgrama. Iz talamusa se signali prenose u druga bazalna područja te u somatosenzorno područje I i II parijetalnog korteksa gdje se dalje obrađuju (Dobrića-Dintinjana i sur., 2012). Obrada bolnog podražaja u hipotalamusu i limbičkom sustavu pokreće stresni odgovor, a obradom u retikularnom području se potiče osjećaj budnosti, dok je korteks odgovoran za iskustvenu percepciju bolnog podražaja (Morović-Vergles, 2007). Paleospinotalamičnim putem se prenose spori bolni signali C vlaknima koja završavaju u lamininama II i III, a to se područje dorzalnih rogova još naziva želatinozna tvar. Signal se prenosi kroz jedan ili više interneurona unutar dorzalnog roga u laminu V na neurone čiji se aksoni pridružju vlaknima brzog neospinotalamičnog puta. Većina vlakana paleospinotalamičnog puta završava u nižim dijelovima mozga za koje se smatra da su važni za osjećaj patnje: retikularne jezgre medule, ponsa i mezencefalona, tenktorij te periakveduktalno sivo područje (Guyton i Hall, 2016).



Slika 2. Prijenos bolnih signala prema mozgu neospinotalamičkim i paleospinotalamičkim putom. Modificirano prema [www.frca.co.uk](http://www.frca.co.uk).

### 1.2.2. Neurotransmitori bolnog puta

Glavni ekscitacijski neurotransmitor u nocicepciji je glutamat. On se luči u fiziološkim uvjetima iz aktiviranih A $\delta$  i C živčanih završetaka u leđnoj moždini, a pokazuje brzo djelovanje koje traje nekoliko milisekunda. On se veže na ionotropne AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kiselina) receptore, koji su odgovorni za brzu sinaptičku transmisiju i NMDA (N-metil-D-aspartat) receptore koji se aktiviraju kod učestalog ulaza impulsa s periferije. Receptori su nalaze na perifernim okončinama aferentnih vlakana, neuronima dorzalnog roga kralježnične moždine i neuronima talamusa. Glutamat u dorzalnom rogu kralježnične moždine pokazuje i presinaptičko djelovanje na NMDA receptore na membranama središnjih grana aferentnih senzornih vlakana, čime se povećava lučenje neurotransmitora u središnje sinapse. Iz C vlakana se osim glutamata luči i supstanca P (SP) koja se veže na neurokininske NK1 receptore te pojačava postsinaptičku ekscitaciju spinalnih neurona. SP pokazuje sporije i dulje ekscitacijsko djelovanje u odnosu na glutamat. Smatra se da te razlike u brzini i trajanju djelovanja doprinose „dvostrukom“ osjećaju boli (Guyton i Hall, 2016; Morović-Vergles, 2007).

Osim gore navedenih, postoje razni neurotransmitori koji sudjeluju u prijenosu bolnih signala, a njihova lokalizacija ovisi o vrsti nociceptora, položaju živčanog završetka i dr. Važnu ulogu u transmisiji imaju tahikinini, vazoaktivni intestinalni peptid, CGRP, somatostatin, faktor lučenja kortikotropina (CRF),olecistokinin, galanin. Njih izlučuju središnje okončine aferentnog senzornog vlakna. U transmisiji boli sudjeluju i razni medijatori iz ne-živčanih

izvora, a najznačajniji su adenzin tri-fosfat (ATP), dušik-2-oksidi (NO), prostaglandini i različiti neurotropini (Bach-Rojecky, 2006; Milan, 1999). Također, zamijećena je modulatorna uloga glija stanica na razini kralježnične moždine. Aktivirane glija stanice ekspresiraju citokine koji potiču oslobađanje dušičnog oksida i čimbenika rasta (Morović-Vergles, 2007).

Interneuroni kralježnične moždine i talamusa ekscitacijskim i inhibicijskim mehanizmima moduliraju nociceptivnu transmisiju. Tvari koje doprinose ekscitacijskom efektu su ekscitacijske aminokiseline, supstancija P, vazoaktivni intestinalni peptid i neurotensin. Opioidi, acetilkolin, kanabinoidi i  $\gamma$ -aminomaslačna kiselina (GABA) djeluju inhibicijski na transmisiju bolnog signala tako što se vežu na presinaptičke završetke perifernih neurona i moduliraju otpuštanje glutamata. Također, opioidi i GABA postsinaptički moduliraju transmisiju putem kalijevih i kloridnih kanala stvarajući hiperpolarizacijski inhibicijski potencijal (Morović-Vergles, 2007; Bach-Rojecky, 2006).

### **1.2.3. Senzitivizacija i mehanizmi nastanka**

Senzitivizacija je fenomen svojstven osjetu boli, a javlja se kod učestalog podraživanja nociceptora čime se osjet boli pojačava. Kod dugotrajnog podraživanja bol prelazi iz akutne u kroničnu. Senzitivizacija je karakteristična za upalnu i neuropatsku bol, a javlja se na perifernoj i središnjoj razini.

Periferna senzitivizacija nastaje uslijed lučenja medijatora upale (npr. bradikinin, prostaglandini, serotonin, NO...) i njihovog vezanja na metabotropne receptore spregnute s G-proteinima. Time se aktiviraju unutarstanični signalizacijski putevi te dolazi do fosforilacije ionskih kanala kao što su  $K^+$  i  $Na^+$  kanali, te receptora (npr., vaniloidnih TRPV1). Posljedično dolazi do smanjenja praga aktivacije nociceptora čime se povećava podražljivost membrana perifernih aferentnih završetaka. Dolazi do spontanog izbijanja akcijskog potencijala, neovisno o podražaju.

Središnja senzitivizacija označava povećanu ekscitabilnost neurona drugog reda smještenih u dorzalnom rogu kralježnične moždine te uključuje kompleksne promjene. Javlja se kao posljedica periferne senzitivizacije i učestalih ulaza bolnih impulsa s periferije. Razlikuje se brza i odgođena središnja senzitivizacija.

*Brza senzitivizacija* nastaje zbog djelovanja glutamata i neuropeptida izlučenih iz središnjih aksona primarnih neurona. Kod pojačanog ulaska bolnih signala dolazi do aktivacije NMDA glutamatnih receptora na postsinaptičkoj membrani što uzrokuje povećanu unutarstaničnu



kocentraciju  $Ca^{2+}$  što uzrokuje aktivaciju neuronalne NO sintaze. Ona katalizira stvaranje NO koji difundira u presinaptički neuron te aktivira kaskadu NO-ciklički gvanozin monofosfat (cGMP) čime se potiče izlučivanje glutamata i SP. Lučenje glutamata potiče i vezanje SP na autoreceptore na presinaptičkoj membrani aferentnih vlakana. SP,  $Ca^{2+}$  te drugi kinini djelovanjem preko metabotropnih receptora središnjih neurona aktiviraju protein kinaze koje fosforiliraju receptore i ionske kanale, čime se povećava njihova podražljivost. Također, dolazi do povećanja broja NMDA receptora.

Ulogu u nastanku središnje senzitivacije ima i smanjena aktivnost inhibicijskih mehanizama u dorzalnom rogu zbog gubitka intersticijskih interneurona i smanjene sinteze inhibicijskih neurotransmitora (npr., GABA i glicin). Također, stanice mikroglia aktivirane inflamatornim medijatorima pojačavaju senzitivaciju lučenjem kemokina, citokina i ostalih ekscitatornih neuromodulatora.

Odgodena senzitivacija nastaje zbog promjena na transkripcijskoj razini u neuronima dorzalnog roga, a za koje se smatra da ih regulira MAP kinaza. Pod utjecajem oslobođenih transkripcijskih faktora (npr. iz glija stanica), povećava se ekspresija gena za c-fos i ciklooksigenazu 2 (COX2) što dovodi do sinteze prostaglandina koji djeluju ekscitacijski (Woolf, 2011; Bach-Rojecky 2006).

Dominantni simptomi koji se javljaju kao posljedica senzitivacije u upalnoj i neuropatskoj boli su hiperalgezija i alodinija.

- Hiperalgezija je stanje povećane osjetljivosti na bolne podražaje. Može nastati na mjestu ozljede zbog promjena u perifernim nociceptivnim neuronima (primarna) ili izvan mjesta ozljede (sekundarna). Kompleksni mehanizmi nastanka sekundarne hiperalgezije nisu još do kraja razjašnjeni. Smatra se da ulogu imaju zbivanja na periferiji, a jednom kad se sekundarna preosjetljivost razvije više ne ovisi o signalima iz periferije.
- Alodinija označava osjetljivost na podražaje koji nisu bolni u normalnim uvjetima, a smatra se da nastaje aktivacijom  $A\beta$  vlakana čija stimulacija inače ne uzrokuje bol. Također, važnu ulogu ima i središnja senzitivacija te promjene neurona dorzalnog roga koje uključuju inervaciju lamina II i IV  $A\beta$ -vlaknima. Te lamine su inače područja inervacije nociceptivnih  $A\delta$  i C vlakana. Zbog toga neuroni drugog reda počinju primati signale manjeg podražaja (npr. dodir) te se oni registriraju kao bolni podražaji (Bach-Rojecky, 2006).

#### 1.2.4. Modulacija nocicepcije

Dosada opisani mehanizmi koji utječu na percepciju boli reguliranjem prijenosa bolnih informacija su:

- a) Segmentalna inhibicija - prema teoriji o kontroli boli vratima („gate theory“) djelovanjem bolnog podražaja istovremeno se aktiviraju i ne-nociceptivni mehanoreceptori niskog praga podražljivosti, koji aktiviraju inhibicijske interneurone dorzalnog roga kralježnične moždine. Oni putem GABA-e ili endorfina smanjuju transmisiju bolnog signala. Zbog toga je prirodna reakcija npr. kod udarca nožnog palca trljanje mjesta ozljede (Guyton i Hall, 2016; Bach-Rojecky 2006).
- b) Silazni (descendentni) putovi mogu inhibirati ili pojačavati transmisiju u dorzalnom rogu kralježnične moždine. Periakveduktna siva tvar (PAG) srednjeg mozga izvor je opioidima posredovane silazne inhibicije nocicepcije. Osim što prima bolne signale iz uzlaznih puteva, ona je povezana i s korteksom i amigdalom koji utječu na njenu funkciju. PAG primarno djeluje na modulaciju boli putem rostroventromedialne medule (RVM) u kojoj se nalaze serotoninergični neuroni jezgara raphe magnus čija vlakna silaze u stražnje robove kralježnične moždine. RVM pokazuje efekt inhibicije i facilitacije nocicepcije putem „off“ i „on“ stanica. Ulogu u modulaciji imaju i noradrenergični silazni putovi koji su povezani sa RVM i PAG. Njihovom stimulacijom dolazi do oslobađanja noradrenalina koji modulira transmisiju bolnog signala. Inhibicijski silazni putovi smanjuju nocicepciju tako što djeluju inhibitory na središnje završetke primarnih neurona ili djeluju inhibitory na ekscitacijske interneurone, dok na inhibicijske interneurone djeluju ekscitacijski. Djelovanje ekscitacijskih silaznih putova na transmisiju ovisi o vrsti neurona na koji djeluju i o receptorima na koje se vežu neurotransmitori. Primjerice, 5-hidroksitriptamin uglavnom djeluje antinociceptivno ako se veže na 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub> ili 5-HT<sub>7</sub> receptore, a ako se veže na 5-HT<sub>2A</sub> ili 5-HT<sub>3</sub> većinom pojačava nocicepciju. Vezanjem noradrenalina na presinaptičke ili postsinaptičke  $\alpha$ <sub>2</sub>-adrenergičke receptore smanjuje se nocicepcija, a vezanjem na  $\alpha$ <sub>1</sub>-receptore pojačava. Također, razni čimbenici kao što su stah, stres, depresija, tjeskoba, mogu utjecati na aktivnost silaznih puteva. Na intenzitet boli utječe i kontekst u kojem se ozljeda događa. Primjerice, zamijećeno je da vojnici ranjeni u bitci bol osjećaju slabije od očekivane za određenu ozljedu (Guyton i Hall, 2016; Kopf i Patel, 2010). Smatra se da poremećena regulacija silaznih modulacijskih putova ima važnu ulogu u razvoju kronične boli (Ossipov i sur., 2014).

### **1.2.5. Liječenje boli**

Bol je fenomen koji zahtjeva multidisciplinarni pristup liječenju. Glavni pristup liječenju boli se bazira na temelju farmakoterapije ponekad uz dodatne psihološke i fizikalne postupke. U slučajevima kada je to potrebno koriste se invazivne metode kao što je kirurški zahvat pomoću kojeg dolazi do uklanjanja uzroka i smanjenja boli. Jedna od neinvazivnih metoda je terapija VIP-svjetlom koje djeluje preko stanične membrane i povoljno utječe na regeneracijske procese kao što su lokalna mikrocirkulacija, stanični imuni i humoralni odgovor te tako ubrzava cjeljenje (Persoli-Gudelj i sur., 2016). Cilj liječenja je što prije i efikasnije ukloniti ili ublažiti bol uz minimalne ili prihvatljive nuspojave.

Svjetska zdravstvena organizacija je na temelju intenziteta boli izradila trostupanjku ljestvicu koja služi kao algoritam za racionalan odabir lijekova u terapiji maligne i nemaligne boli ([www.evidence.nhs.uk](http://www.evidence.nhs.uk)). U prvom koraku preporuča se korištenje neopioidnih analgetika (NSAIL i paracetamol). U drugom i trećem koraku se uz navedene analgetike koriste slabi, odnosno jaki opioidni agonisti koji pojačavaju silaznu inhibiciju i smanjuju lučenje ekscitacijskih neurotransmitora. Oni se koriste kao druga linija u terapiji boli zbog ozbiljnih nuspojava kao što su razvoj ovisnosti, konstipacija, mučnina i povraćanje (Wall i Melzack, 2006).

U svakom koraku se ovisno o mehanizmu boli mogu koristiti adjuvantni analgetici kao što su antiepileptici (karbamazepin, pregabalin), triciklički antidepresivi (amitriptilin, doksepin), antiaritmiци te lokalni anestetici. Oni moduliraju funkciju nociceptora te utječu na nastanak i provođenje bolnih signala (Persoli Gudelj i Lončarić-Katušin, 2015).

U fazi ispitivanja se nalaze lijekovi s novim mehanizmima analgetskog djelovanja kao što su agonisti TRPV1 receptora, antagonisti purinergičnih receptora, serotoninergičnih 5-HT<sub>3</sub> i glutamatnih receptora, te kanabinoidi (Wolkerstorfer i sur., 2016; Machu, 2011).

### **1.3. Analgetsko djelovanje BT-A**

Antinociceptivno djelovanje botulinum toksina prvi put je zamijećeno u studiji koja je ispitala njegov učinak kod osoba s cervikalnom distonijom. Analgetsko djelovanje nastupilo je prije miorelaksirajućeg, što je upućivalo na to da smanjenje boli nije nužno povezano sa smanjenjem spastičnosti mišića i ishemije, te da mora postojati i odvojen mehanizam antinociceptivnog djelovanja botulinum toksina (Aoki i Francis, 2011).

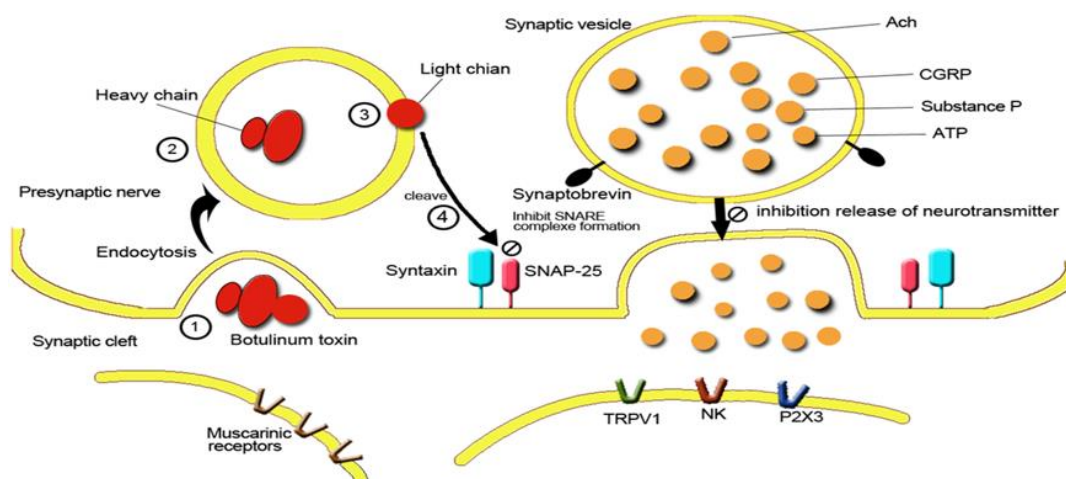
BT-A pokazuje analgetsko djelovanje i u kroničnim bolnim stanjima koja nisu povezana s poremećenom funkcijom mišića, kao što su neuropatska bol i migrena (Matak i Lacković,

2014). Iako su se u posljednjih 15 godina provodila brojna istraživanja o djelovanju BT-A na kroničnu bol, mehanizam djelovanja na nocicepciju nije još u potpunosti razjašnjen.

Većina dokaza koji podupiru hipotezu o antinociceptivnom djelovanju prikupljeni su pretkliničkim istraživanjima na *in vivo* životinjskim modelima. Tako je djelovanje BT-A na bol pokazano u modelima upalne boli (formalinski test, kapsaicinski i karagenanski test, upala zgloba), neuropatske boli (dijabetička neuropatija, oštećenje ishijadičnog ili okcipitalnog živca, bol uzrokovana paklitakselom), modelima zrcalne boli, kroničnog cistitisa, dok na akutnu nociceptivnu bol ne djeluje (Matak i Lacković, 2014). Pretkliničkim je ispitivanjima pokazano da nakon jednokratne lokalne primjene BT-A dugotrajno smanjuje bolnu preosjetljivost (nekoliko tjedana), a ako se primijeni intratekano djeluje u 5 puta nižoj dozi uz brži i još duži učinak.

Dugo vremena je bila zastupljen antinociceptivna hipoteza perifernog djelovanja BT-A koja se temelji na dvijema postavkama:

- Botulinum toksin primijenjen periferno inhibira otpuštanje neurotransmitora bolnog puta (glutamat, CGRP, SP) iz primarnih neurona te utječe na smanjenje površinske ekspresije receptora, npr. TRPV1, tako što cijepanjem proteina SNAP-25 onemogućava proces fuzije vezikula sa membranom (Slika 3).
- Smanjenjem aktivnosti primarnih neurona posredno se sprječava središnja senzitivacija te nastajanje kronične boli (Aoki i Francis, 2011).



Slika 3. Shematski prikaz inhibitorynog djelovanja BT-A na egzocitozu neurotransmitora bolnog puta (Jhang i Kuo, 2015).

U novije vrijeme sve je više dokaza koji sugeriraju da je primarno mjesto antinociceptivnog djelovanja BT-A u središnjem živčanom sustavu.

U modelu bilateralne boli izazvane injekcijom kisele fiziološke otopine u gastrocnemius mišić stražnje noge štakora, unilateralno primjenjen BT-A spriječio je nastanak bilateralne mehaničke hiperalgezije što se nije moglo objasniti pretpostavkom da BT-A djeluje samo periferno na mjestu primjene, budući da se mehanizam mehaničke hiperalgezije temelji na središnjoj senzitivaciji i uključuje supraspinalne putove (Bach-Rojecky i sur., 2005). Bilateralan učinak unilateralno primijenjenog BT-A opažen je i drugim modelima, npr. modelu polineuropatske boli uzrokovane paklitakselom te na modelu dijabetičke boli uzrokovane streptozotocinom (Matak i Lacković, 2014; Bach-Rojecky i sur., 2010; Favre-Guilmard i sur., 2009).

Istraživanja su također pokazala da periferno primijenjen BT-A, iako smanjuje hiperalgeziiju, ne djeluje na periferni edem uzrokovan karagenanom, niti na hiperemiju uzrokovanu kapsaicinom. Dosisocijacija između djelovanja na bol i upalu ukazala je na složenije djelovanje BT-A i dovela u pitanje utemeljenost teorije o perifernom mjestu njegova djelovanja (Bach-Rojecky i Lacković, 2005; Bach-Rojecky i sur., 2008.)

Na temelju navedenih opažanja, posebice bilateralnog učinka nakon unilateralne primjene i bržeg djelovanja nakon intratekalne primjene, predložena je teza o središnjem učinku BT-A na nocicepciju koja pretpostavlja putovanje BT-A s mjesta primjene u središnji živčani sustav (Bach-Rojecky i sur., 2010). Mogućnost prijenosa u SŽS putem krvi je isključena zbog korištenja malih doza koje ne uzrokuju sistemsku toksičnost, te zbog veličine BT-A koja mu onemogućava prijelaz kroz krvno-moždanu barijeru. Druga mogućnost je postojanje aksonalnog transporta za kojeg se dugo vremena smatralo da je prespor ili da ne postoji (Matak i Lacković, 2014). Premda se ranija istraživanja neuronalnog transporta radioaktivno obilježenog BT-A zbog tehničkih i metodoloških nedostataka ne mogu smatrati pouzdanima, noviji pristupi istraživanju aksonalnog transporta dali su važne reproducibilne rezultate. Korištena su pritom dva pristupa: jedan, bihevioralni koji je temeljen na primjeni farmakološkog blokatora aksonalnog transporta kolhicina te drugi, imunokemijski kojim je ispitivana prisutnost nastalog produkta proteolitičkog djelovanja Bt-A na višim razinama.

Na postojanje i važnost aksonalnog transporta po prvi puta je uputila već spomenuta studija na modelu bilateralne boli (Bach-Rojecky i Lacković, 2009): bilateralno smanjenje hiperalgezije nakon primjene BT-A ne strani ozljede izostalo je ako je ispilateralni ishijadični

živac prethodno tretiran s kolhicinom. Međutim, ukoliko se kolhicin primijenio na suprotnu stranu, kontralateralno od ozljede i BT-A, učinak toksina je izostao samo na kontralateralnoj strani čime je potvrđen aksonalni transport iz perifernih živaca u SŽS (Bach-Rojecky i Lacković, 2009).

Na modelu trigeminalne neuropatije uzrokovane formalinom ispitivan je aksonalni transport BT-A senzornim neuronima. Injekcijom BT-A u njušku štakora došlo je do smanjenja orofacijalne boli, a injiciranjem kolhicina u trigeminalni ganglij učinak je izostao što također upućuje na važnost aksonalnog transporta i u područje trigeminalne inervacije (Filipović i sur., 2012; Matak i sur., 2011).

Imunohistokemijskim metodama indirektno je dokazana aktivnost BT-A u SŽS detekcijom pocijepanog proteina SNAP-25 (Matak i sur., 2012; Matak i sur., 2011; Antonucci et al., 2008). Pocijepani SNAP-25 detektiran je uzduž nocicepcijskog puta: na mjestu primjene BT-A, u pripadajućem neuronu, perifernom gangliju i leđnoj moždini. (Marinelli i sur., 2012).

In vitro ispitivanjem na kulturi stanica primarnih motornih neurona uočen je retrogradni aksonski transport fluorescentno označenih BT-A i BT-E u obliku kompleksa i u obliku lanaca (Restani i sur., 2012).

Studija provedena prošle godine istraživala je retrogradni transport te potencijalni distalni učinak BT-A na kulturi stanica neurona. Uočeno je da, osim već dokazanog transporta putem SV-2 proteina koji tvore kisele vezikule, BT-A ulazi u stanicu i alternativnim putem pomoću organela koje nemaju kiseli pH što omogućava transcitozu i interneuronski transport BT-A u obliku holotoksina (Bomba-Warczak i sur., 2016). Ovu mogućnost je potrebno dodatno ispitati u različitim uvjetima.

Iako postoje brojni dokazi koji upućuju na antinociceptivno djelovanje na razini SŽS-a, mehanizam djelovanja je još nepoznat. Dosadašnja ispitivanja, osim inhibicije egzocitose neurotransmitora posredovane SNARE proteinom, upućuju i na povezanost s opioidnim i GABA-ergičnim sustavom (Drinovac i sur., 2014; Matak i Lacković, 2014).

## 2. Obrazloženje teme

Neodgovarajuća terapija boli jedan je od važnih medicinskih problema. Usprkos tome što nam na raspolaganju stoje razni analgetici, brojna kronična bolna stanja su refraktorna na postojeću terapiju. BT-A je do sada u raznim istraživanjima pokazao vrlo poželjno dugotrajno (višemjesečno) analgetsko djelovanje uz minimalne nuspojave nakon jednokratne lokalne primjene malih doza što ga čini potencijalno vrlo korisnim analgetikom.

Točan mehanizam djelovanja BT-A na bol još uvijek je nedovoljno jasan. Iako se dugo vremena smatralo da BT-A analgetsko djelovanje ispoljava na periferiji, novije studije ukazuju da je mjesto djelovanja u središnjem živčanom sustavu gdje periferno primijenjen BT-A dolazi pomoću retrogradnog aksonalnog transporta. Na kojoj razini SŽS-a BT-A djeluje još uvijek je nepoznato, ali sve veći broj eksperimentalnih dokaza ukazuju da bi primarno mjesto antinociceptivnog djelovanja moglo biti dorzalni rog kralješnične moždine.

Cilj ovog rada bio je istražiti djelovanje BT-A na bol nakon njegove primjene u moždane komore (intracerebroventrikularno) ili u cisternu magnu (intracisternalno). Istraživanje se provelo na modelu upalne boli uzrokovane formalinom, a kao pozitivna kontrola korištena je ista doza BT-A primijenjenog u spinalni kanal (intratekularno). Ovo istraživanje, kao dio većeg projekta, pomoći će u razjašnjavanju mjesta djelovanja BT-A na bol, odnosno ponuditi odgovore na pitanje je li djelovanje BT-A segmentalno, u kralježničnoj moždini, ili ipak zahvaća i više supraspinalne centre.

### **3. Materijali i metode**

#### **3.1. Životinje**

Ispitivanja bolnog ponašanja provedena su na mužjacima štakora soja Wistar, starim 4 mjeseca, koji su uzgajani na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. U pokusima na laboratorijskim životinjama poštivane su smjernice Međunarodne udruge za istraživanje boli (engl., *International Association for Study of Pain, IASP*) te Zakon o zaštiti životinja (NN 125/13), kao i direktiva Europske unije za rad na laboratorijskim životinjama (2010/63/EU). Za obavljanje istraživanja dobivena je dozvola Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (br. 72.3-13, HR 191/02/P), a sve pokuse su izvodile osobe s dozvolom za rad s pokusnim životinjama.

#### **3.2. Ispitivana tvar -BT-A**

U pokusima je korišten BT-A (Botox<sup>®</sup>, Allergan, SAD). Bočica komercijalnog pripravka Botoxa<sup>®</sup> sadrži 100 internacionalnih jedinica (i.j.) pročišćenog BT-A u obliku liofilizata. Jedna internacionalna jedinica odgovara količini toksina koja nakon i.p. primjene uzrokuje smrt 50% miševa (LD50 = 0,048 ng = 1 i.j.). BT-A je primijenjen u dozi od 1 i.j./kg i.c. (intracisternalno, 10 µL) i i.c.v. (intracerebroventrikularno, 5 µL). BT-A otopljen je u fiziološkoj otopini (0.9 % NaCl), a apliciran je Hamilton špicama (MICROLITER syringe 10 µL, Hamilton, Höchst, Njemačka) duboko anestetiziranim životinjama.

#### **3.3 Eksperimentalni model boli: formalinski test i orofacijalni formalinski test**

U plantarnu površinu stražnje desne šape štakora subkutano je injicirano 50 µL 5%-tnog formalina, dobivenog iz 35 %-tnog razrjeđivanjem s vodom u omjeru 1:7. Kao pokazatelj boli pratio se broj trzaja i lizanja tretirane šape u razdoblju od 60 min. Formalin primijenjen subkutano u šapu štakora uzrokuje reproducibilnu dvo-fazičnu bol. Prva je faza (0-15 min) posljedica izravnog podražaja nociceptora formalinom. Druga faza (15-60 min), koja predstavlja upalnu bol, je posljedica djelovanja oslobođenih upalnih medijatora, a pretpostavlja se i periferne, te središnje senzitivacije (Bach Rojecky, 2006).



Za izvođenje orofacijalnog formalinskog testa, u područje njuške štakora injicirano je subkutano 50  $\mu$ l 2.5 %-tnog formalina. Kao pokazatelj boli prati se vrijeme trljanja područja brkova tretiranog formalinom. Orofacijalni test također karakterizira bifazična bol, ali s kraćim trajanjem u odnosu na test na šapi: prva faza traje 12 min, a druga 12-45 min. (Raboisson i Dallel, 2004.)

### **3.4. Eksperimentalni protokol**

Za izvođenje formalinskog testa na šapi, BT-A je primijenjen jednoj skupini životinja intracisternalno, a drugoj intracerebroventrikularno 3 dana prije izvođenja testa. Kod orofacijalnog formalinskog testa BT-A je primijenjen samo intracisternalno 3 dana prije izvođenja. Kontrolnim životinjama je umjesto BT-A injiciran odgovarajući volumen fiziološke otopine. Tijekom i.c. i i.c.v. primjene životinje su bile anestezirane inhalacijskim anestetikom izofluranom.

Intracisternalna primjena je izvedena direktnim injiciranjem između zatiljnog grebena i atlasa kroz kožu i tvrdi moždani ovojnicu u cisternu magnu (Nirogi i sur., 2009). Ispravnost primjene je provjerena ekstrakcijom male količine cerebrospinalnog likvora prilikom injiciranja.

Za intracerebroventrikularnu primjenu u lateralne moždane komore načinjen je rez veličine 1 cm na gornjem dijelu glave te je izbušen otvor promjera 1 mm u obje parijetalne kosti, 1.5-2 mm dijagonalno od križanja sagitalnog i koronalnog šava. Ukupna doza je podijeljena na 2 jednaka volumena (po 2.5  $\mu$ L) te injicirana u obje komore, na dubinu od 4 mm (Noble i sur., 1967.)

Životinje su se nalazile u transparentnim kavezima, a ispitivanja su provedena u vremenu između 9 i 14 h.

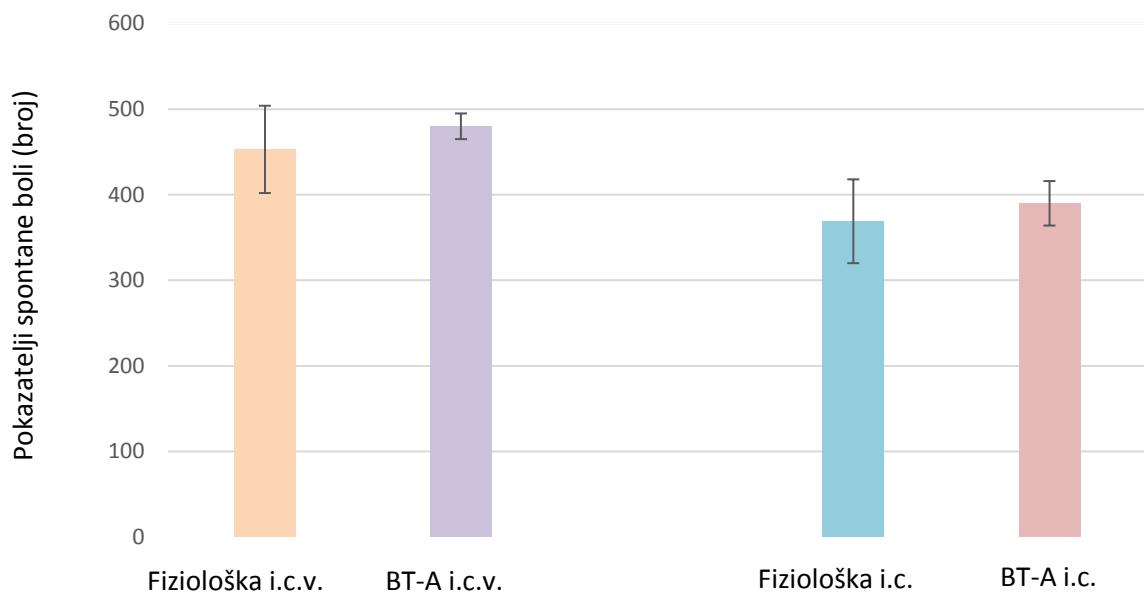
### **3.5. Statistička obrada rezultata**

Rezultati pokusa izraženi su kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija i prikazani su u obliku grafa sa stupcima. Statistička obrada podataka napravljena je pomoću testova dostupnih na mrežnoj stranici VassarStats. Nakon analize varijance (One-way ANOVA), razlike između skupina analizirane su Tukey *post hoc* testom. Značajne su sve p vrijednosti manje od 0,05.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu su kao modeli boli za supraspinalno primijenjen BT-A korišteni formalinski test na šapi i orofacijalni formalinski test. Na ovim formalinskim modelima su do sada provedena brojna istraživanja koja su potvrdila antinociceptivno djelovanje BT-A nakon periferne primjene, kao i nakon intratekalne i intraganglijske primjene. Međutim, do sada nije razjašnjeno na kojoj razini BT-A djeluje. Pokazano je na modelu dijabetičke neuropatije uzrokovane streptozotocinom da intratekalno primijenjen BT-A smanjuje mehaničku i termalnu hiperalgeziju u nižoj dozi u usporedbi s perifernom primjenom (1 i.j./kg u odnosu na 3,5 i.j./kg), a učinak počinje prije (unutar 24 h kod intratekalne primjene u odnosu na 5 dana kod periferne primjene) i traje duže (Bach-Rojecky i sur., 2010). Također, slično je pokazano i na modelu zrcalne boli uzrokovane kiselom fiziološkom otopinom gdje je intratekalno primijenjen BT-A (1 i.j./kg) smanjio mehaničku hipersenzitivnost (Bach-Rojecky i Lacković, 2009). Ovi podaci sugeriraju da je primarno mjesto djelovanja BT-A na bolnu preosjetljivost dorzalni rog kralježnične moždine. Međutim, moguće je da BT-A djeluje na perifernu bol i nakon primjene u viša supraspinalna područja, poput cisterne magne ili moždanih komora. Stoga je osnovni cilj ovog rada ispitati moguće supraspinalno mjesto djelovanja BT-A na bol i to u dva eksperimentalna modela, jednom u području inervacije ishijadičnog živca, i drugom u području trigeminalne inervacije.

Rezultati provedenog formalinskog testa su, sukladno s dosadašnjim ispitivanjima, potvrdili da BT-A ne smanjuje akutnu nociceptivnu bol, odnosno nema utjecaj na prvu fazu formalinskog testa neovisno o mjestu primjene (Cui i sur., 2004.), stoga su u ovom radu prikazani podaci samo druge faze. Rezultati bihevioralnog ispitivanja na štakorima kojima je formalin injiciran u stražnju šapu pokazuju da BT-A primijenjen i.c. i i.c.v., u dozi 1 i.j./kg, 3 dana prije izvođenja testa, ne pokazuje antinociceptivan učinak u drugoj fazi formalinskog testa (slika 4).

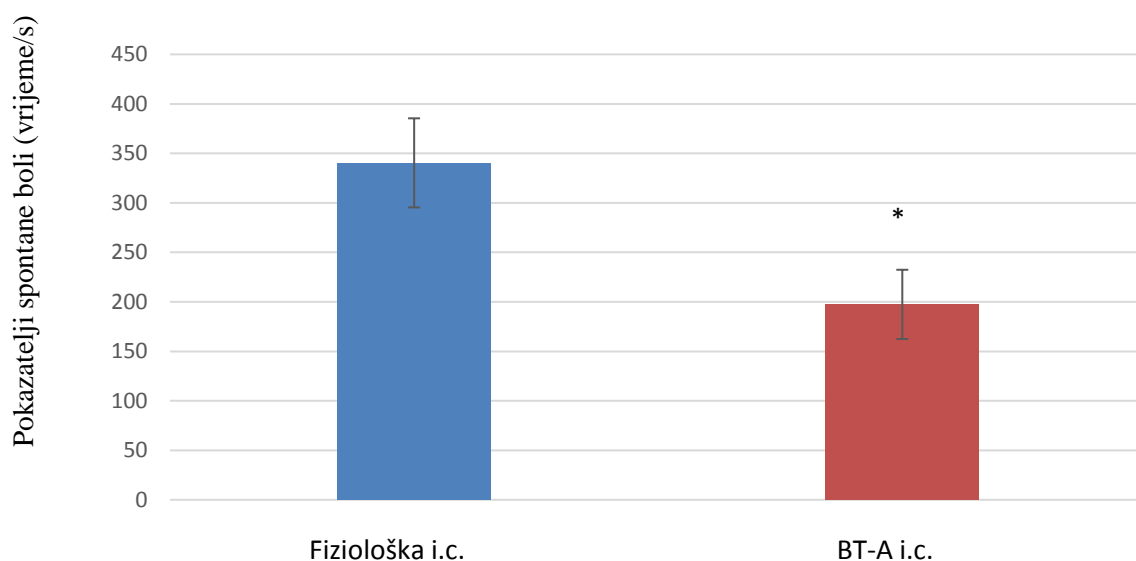


*Slika 4. Rezultati 2. faze formalinskog testa na šapi: izostanak antinociceptivnog učinka kod i.c.v. i i.c. primjenje BT-A. Mjerenje je izvedeno 3 dana nakon i.c. ili i.c.v. injekcije BT-A (1 i.j./kg). Kao pokazatelji spontane boli pratio se broj lizanja i trzaja šape nakon injiciranja 5%-tne otopine formalina. Aritmetička sredina  $\pm$  SEM, n=5-6.*

Nakon bihevioralnog ispitivanja uzeti su uzorci moždanog tkiva kako bi se utvrdila distribucija BT-A u regijama mozga nakon supraspinalne primjene (ovo ispitivanje nije predmet ovog diplomskog rada). Kao marker prisutnosti aktivnog BT-A ispitivao se imunohistokemijskom lokalizacijom cl-SNAP-25, protein koji nastaje enzimskim cijepanjem SNAP-25. Nakon i.c.v. primjene, cl-SNAP-25 detektiran je u različitim regijama mozga koje su uključene u nocicepciju, primjerice u talamusu, hipokampusu, periakveduktalnoj sivoj tvari. Nakon i.c. primjene zabilježena je prisutnost cl-SNAP-25 u produženoj moždini i u lokus ceruleusu. Ovi rezultati se mogu usporediti s rezultatima istraživanja provedenog na modelu bilateralne boli uzrokovane unilateralnom primjenom karagenana gdje je pokazano da BT-A smanjuje nocicepciju nakon periferne ipsilateralne i intratekane primjene, ali ne i kada je primijenjen intracisternalno (Drinovac Vlah i sur., 2016). Rezultati imunohistokemijske detekcije pocijepanog SNAP-25 kao markera prisutnosti enzimske aktivnosti BT-A pokazuju da BT-A nakon i.c. i i.c.v. aplikacije putuje u duboka supraspinalna nocicepcijska područja iako nakon takve primjene ne smanjuje bol. Time se isključuje supraspinalna razina kao mjesto interferencije BT-A s prenošenjem bolnih informacija.

Dosadašnja istraživanja upućuju da bi mehanizam segmentalnog antinociceptivnog djelovanja uključivao opioidni i GABA-ergični sustav. Na modelima neuropatske boli i upalne boli uzrokovane karagenanom i formalinom uočen je sinergističan učinak BT-A i morfina u dozi u kojoj inače ne smanjuje bol. Drinovac i suradnici su 2013. na formalinskom modelu upalne boli dokazali da selektivni i neselektivni opioidni antagonisti, naloksazin i naltrekson, smanjuju antinociceptivni učinak BT-A što se očitovalo povećanim brojem lizanja i trzanja šape tretirane formalinom u odnosu na životinje kojima antagonist nije apliciran. Također je pokazano da aplicirani antagonist sprječava smanjenu ekspresiju c-Fos proteina u leđnoj moždini, a koja služi kao mjera neuronske aktivnosti u putovima za prijenos bolnih signala. U ispitivanju provedenom s antagonistom GABA-A receptora, bikukulinom koji je primijenjen intratekalno i intraperitonealno, također je izostao antinociceptivni učinak BT-A, dok bikukulin primijenjen u cisternu magnu nije utjecao na učinak BT-A što ponovno upućuje na segmentalno djelovanje BT-A na razini kralježnične moždine (Drinovac i sur., 2014; Matak i Lacković, 2014; Drinovac i sur., 2013).

Nakon i.c. primjene također je zabilježena prisutnost cl-SNAP25 u trigeminalnoj kaudalnoj jezgri koja je analogna dorzalnog rogu kralježnične moždine, ali za trigeminalni sustav koji inervira područje glave i vrata. Kako bi se ispitaio antinociceptivan učinak na području trigeminalne inervacije, proveden je orofacijalni formalinski test 3 dana nakon i.c. primjene BT-A (1 i.j./kg), (slika 5). Zabilježen je antinociceptivni učinak na orofacijalnom području koji podržava prisutnost pocijepanog SNAP-25 u trigeminalnoj kaudalnoj jezgri.



*Slika 5. Rezultati 2. faze orofacijalnog formalinskog testa: BT-A je smanjio bol na području trigeminalne inervacije nakon primjene u cisternu magnu (i.c.). BT-A (1 i.j./kg) je injiciran 3 dana prije testa. Kao pokazatelj sponatne boli pratilo se vrijeme trljanja područja brkova nakon injiciranja 2.5%-tnog formalina u njušku. Aritmetička sredina  $\pm$  SEM,  $n=5-6$ ; \*  $P<0.05$  u odnosu na f.o. i.c. (Tukey post hoc)*

U ispitivanju provedenom na orofacijalnom formalinskom modelu boli, BT-A primijenjen u dozi 1 i.j./kg direktno u trigeminalni ganglij pokazao je sličan učinak na smanjenje nocicepcije u drugoj fazi kao i BT-A primijenjen periferno u njušku štakora u dozi 3.5 i.j./kg (Matak i sur., 2011). Antinociceptivan učinak periferno primijenjenog BT-A je potpuno izostao nakon apliciranja kolhicina u trigeminalni ganglij (farmakološki blokator transporta kroz aksone), što također sugerira retrogradni neuronalni transport s mjesta primjene i djelovanje BT-A u središnjim strukturama i u području trigeminalne inervacije. Međutim, da bi se utvrdilo primarno mjesto antinociceptivnog djelovanja za područje trigeminalne inervacije kao i moguća transcitoza, odnosno transport između neurona, potrebna su daljnja istraživanja.

## 5. ZAKLJUČAK

Dobiveni rezultati pokazuju da BT-A primijenjen u cisternu magnu ili u moždane komore ne smanjuje niti akutnu niti upalnu bol u perifernom formalinskom testu provedenom na šapi štakora, iako je imunohistokemijskom detekcijom pocijepanog SNAP-25, produkta djelovanja BT-A, pokazano da BT-A putuje do dubokih supraspinalnih regija koje su uključene u modulaciju nocicepcije. Na temelju ovih rezultata te podataka prikupljenih iz prethodnih istraživanja gdje je jasno uočeno smanjenje boli nakon lokalne, ali i intratekalne primjene može se zaključiti da BT-A u području inervacije ishijadičnim živcem ostvaruje središnji antinociceptivan učinak na segmentalnoj razini, odnosno u kralježničnoj moždini.

Također je pokazano da BT-A nakon primjene u cisternu magnu smanjuje upalnu bol uzrokovanu formalinom u orofacijalnom području. Tome u prilog idu nalazi pocijepanog SNAP-25 u trigeminalnoj kaudalnoj jezgri što predstavlja potencijalno mjesto antinociceptivnog djelovanja za područje trigeminalne inervacije.

Rezultatima ovog diplomskog rada pokazano je središnje, ali segmentalno mjesto djelovanja BT-A na bol. Mehanizam kojim bi se središnji antinociceptivan učinak BT-A mogao odvijati još nije utvrđen, ali dosadašnja istraživanja upućuju na povezanost s opioidnim i GABA-ergičnim sustavom koji inhibiraju transmisiju bolnih signala na razini kralježnične i produžene moždine. Razjašnjavanje središnjeg antinociceptivnog djelovanja BT-A predstavlja izazov za daljna istraživanja.

## 6. LITERATURA:

Antonucci F, Rossi C, Gianfranceschi L, Rossetto O, Caleo M. Long distance retrograde effects of botulinum neurotoxin A. *J Neurosci*, 2008, 28, 3689-3696.

Aoki KR, Francis J. Updates on the antinociceptive mechanism hypothesis of botulinum toxin A. *Parkinsonism Relat Disord*, 2011, 17 (Suppl 1), S28-33.

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

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

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, Šalković-Petrišić M, Lacković Z. Botulinum toxin type A reduces pain supersensitivity in experimental diabetic neuropathy: bilateral effects after unilateral injection. *Eur J Pharmacol*, 2010, 633, 10–14.

Barada A. Neuropatska bol. *Medicus*, 2014, 23(2), 139-143.

Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer S, Julius D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell*, 2009, 139(2), 267-284.

Bomba-Warczak E, Vevea JD, Brittain JM, Figueroa-Bernier A, Tepp WH, Johnson EA. Interneuronal Transfer and Distal Action of Tetanus Toxin and Botulinum Neurotoxins A and D in Central Neurons. *Cell Rep*, 2016, 16(7), 1974-87.

Bosnar Puretić M, Demarin V. Neuroplasticity mechanisms in the pathophysiology of chronic pain. *Acta Clin Croat*, 2012, 51, 425-429.

Botulinum toxin structure, <http://www.ebi.ac.uk/biomodels-main>, pristupljeno 29.5. 2017.

Carruthers A. Botulinum toxin type A: history and current cosmetic use in the upper face. *Dis Mon*, 2002, 48(5),299-322.

- Chen F, Kuziemko GM, Stevens RC. Biophysical characterization of the stability of the 150-kilodalton botulinum toxin, the nontoxic component, and the 900-kilodalton botulinum toxin complex species. *Infect Immun*, 1998, 66(6), 2420-2425.
- Crichton N. Visual analogue scale (VAS). *J Clin Nurs*, 2001, 10(5), 706-6.
- Cui M, Khanijou S, Rubino J, Aoki KR. Subcutaneous administration of botulinum toxin A reduces formalin-induced pain. *Pain*, 2004, 125–133.
- Demarin V. Neuroplasticity and pain. *Acta Clin Croat*, 2013, 52 (suppl. 1), 36-36.
- Dobрила-Dintinjana R, Vukelić J, Dintinjana M, Vanis N, Ružić A, Brkljačić-Žagrović M, Pleština S, Kolić Z. Patofiziologija i liječenje onkološkog bola. *Medi fluminen*, 2012, 48(3), 278-284.
- Dolly JO, Aoki KR. The structure and mode of action of different botulinum toxins. *Eur J Neurol*, 2006, 13 (Suppl. 4), 1-9.
- Drinovac V, Bach-Rojecky L, Matak I, Lacković Z. Involvement of  $\mu$ -opioid receptors in antinociceptive action of botulinum toxin type A. *Neuropharmacol*, 2013, 70, 331-337.
- 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 Vlah V, Bach-Rojecky L, Lacković Z. Antinociceptive action of botulinum toxin type A in carrageenan-induced mirror pain. *J Neural Transm (Vienna)*, 2016, 123 (12), 1403-1413.
- Dressler D, Benecke R. Pharmacology of therapeutic botulinum toxin preparations. *Disabil Rehabil*, 2007, 29(23), 1761-1768.
- Elovic EP1, Esquenazi A, Alter KE, Lin JL, Alfaro A, Kaelin DL. Chemodenervation and nerve blocks in the diagnosis and management of spasticity and muscle overactivity. *PM R*, 2009, 1(9), 842-851.
- Erbguth FJ. From poison to remedy: the chequered history of botulinum toxin. *J Neural Transm*, 2008, 115, 559–565.



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

Filipović B, Matak I, Bach-Rojecky L, Lacković Z. Central action of peripherally applied botulinum toxin type a on pain and dural protein extravasation in rat model of trigeminal neuropathy. *PLoS One*, 2012, 7(1), e29803.

Gold MS, Gebhart GF. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nat Med*, 2010, 16(11), 1248-57.

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

Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology. Philadelphia, Elsevier, 2016, str. 621-626.

Habermann E. 125I-labeled neurotoxin from Clostridium botulinum A: preparation, binding to synaptosomes and ascent to the spinal cord. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1974, 281, 47–56.

Horowitz BZ. Botulinum toxin. *Crit Care Clin*, 2005, 21(4), 825-839.

Jhang JF, Kuo FC. Novel Treatment of Chronic Bladder Pain Syndrome and Other Pelvic Pain Disorders by OnabotulinumtoxinA Injection. *Toxins*, 2015, 7(6), 2232-2250.

Kim DW, Lee SK, Ahnn J. Botulinum Toxin as a Pain Killer: Players and Actions in Antinociception. *Toxins (Basel)*, 2015, 7(7), 2435–2453.

Kopf A, Patel NB. Guide to Pain Management in Low-Resource Settings. International Association for the Study of Pain, 2010, str. 15-16.

Kumar R, Dhaliwal HP, Kukreja RV, Singh BR. The Botulinum Toxin as a Therapeutic Agent: Molecular Structure and Mechanism of Action in Motor and Sensory Systems. *Semin Neurol*, 2016, 36(1), 10-19.

Lacy DB, Tepp W, Cohen AC, DasGupta BR, Stevens RC. Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nat Struct Biol*, 1998, 5(10), 898-90.

- Machu TK. Therapeutics of 5-HT<sub>3</sub> Receptor Antagonists: Current Uses and Future Directions. *Pharmacol Ther*, 2011, 130(3), 338–347.
- Marinelli S, Luvisetto S, Cobianchi S, Makuch W, Obara I, Mezzaroma E, Caruso M, Straface E, Przewlocka B, Pavone F. Botulinum neurotoxin type A counteracts neuropathic pain and facilitates functional recovery after peripheral nerve injury in animal models. *Neuroscience*, 2010, 171(1), 316-28.
- 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.
- Matak I, Riederer P, Lacković Z. Botulinum toxin's axonal transport from periphery to the spinal cord. *Neurochem Int*, 2012, 61(2), 236-239.
- Matak I, Lacković Z. Botulinum toxin A, brain and pain. *Prog Neurobiol*, 2014, 19-21, 35-36
- Milan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*, 1999, 1-164.
- Morović-Vergles J. Patofiziologija kronične boli. *Reumat*, 2007, 54(2), 28-31
- Nantel AJ. Clostridium Botulinum, International Programme on Chemical Safety. WHO, 2002, str. 5-24.
- National Institute for Health and Care Excellence, 2016., <http://www.evidence.nhs.uk>, pristupljeno 5.6.2017.
- 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(1), 116-119.
- Noble EP, Wurtman RJ, Axelrod J. A simple and rapid method for injecting H<sub>3</sub>-norepinephrine into the lateral ventricle of the rat brain. *Life Sci*, 1967, 6(3), 281-291.
- Oguma K, Fujinaga Y, Inoue K. Structure and Function of Clostridium botulinum Toxins. *Microbiol. Immunol*, 1995, 39(3), 161-168
- Ossipov MH, Morimura K, Porreca F. Descending pain modulation and chronification of pain. *Curr Opin Support Palliat Care*, 2014, 8(2), 143–151.

Pain pathways, <http://www.frca.co.uk>, pristupljeno 15.6.2017.

Persoli-Gudelj M, Lončarić-Katušić M. Bol i suzbijanje boli pri kroničnoj rani. *Acta Med Croatica*, 2015, 69 (Supl. 1), 85-90.

Persoli-Gudelj M, Lončarić-Katušić M. *Acta Med Croatica*, 2016, 70 (Supl.1), 53-57.

Persoli-Gudelj M, Lončarić-Katušić M, Mišković P. Bol i smjernice za suzbijanje boli pri kroničnoj rani. *Acta Med Croatica*, 2016, 70 (Supl. 1), 53-57.

Puljak L, Sapunar D. Fenomen boli – anatomija, fiziologija, podjela boli. *Medicus*, 2014, 23(1), 7-13.

Restani L, Giribaldi F, Manich M, Bercsenyi K, Menendez G, Rossetto O, Caleo M, Schiavo G. Botulinum neurotoxins A and E undergo retrograde axonal transport in primary motor neurons. *PLoS Pathog*, 2012, 8(12), e1003087.

Ringkamp M, Meyer R. The senses: a comprehensive reference. Baltimore, Elsevier, 2008, str. 98-102.

Raboisson P, Dallel R. The orofacial formalin test. *Neurosci Biobehav Rev*, 2004, 28(2), 219-226.

Rosetto O, Pirazini M, Montecucco C. Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights. *Nature Rev Microb*, 2014, 12: 535–549

Stenmark P, Dupuy J, Imamura A, Kiso M, Stevens RC. Crystal structure of botulinum neurotoxin type A in complex with the cell surface co-receptor GT1b-insight into the toxin-neuron interaction. *PLoS Pathog*, 2008, 4(8), e1000129.

Tam SL, Gordon T. Neuromuscular activity impairs axonal sprouting in partially denervated muscles by inhibiting bridge formation of perisynaptic Schwann cells. *J Neurobiol*, 2003, 57 (2), 221-234.

Tighe AP, Schiavo G. Botulinum neurotoxins: mechanism of action. *Toxicon*, 2013, 67, 87-93.

Wall P, Melzack R. Textbook of Pain. Philadelphia, Elsevier Churchill Livingstone, 2006, str. 1080-1081.

Wheeler A, Smith HS. Botulinum toxins: Mechanisms of action, antinociception and clinical Applications. *Toxicology*, 2013, 306, 124-146.

Wolkerstorfer A, Handler N, Buschmann H. New approaches to treating pain. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26(4), 1103-1119.

Woolf CJ, Bennett GJ, Doherty M, Dubner R, Kidd B, Koltzenburg M, Lipton R, Loeser JD, Payne R, Torebjork E. Towards a mechanism-based classification of pain? *Pain*, 1998, 77(3), 227-229.

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

Botulinum toksin (BT-A) je najpotentniji poznati toksin te istovremeno farmakološki koristan protein koji ima široku kliničku primjenu. Ispitivanja na životinjama te kliničke studije su pokazale dugotrajno antinociceptivno djelovanje BT-A kod nekih kroničnih bolnih stanja, ali mehanizam djelovanja još nije razjašnjen. Dugo vremena se smatralo da se analgetski učinak postiže na perifernoj razini inhibicijom egzocitoze neurotransmitora uključenih u nastajanje bolnog impulsa. No, sve je više dokaza da nakon periferne primjene BT-A ulazi u neuron i putem aksonalnog transporta dolazi do središnjih okončina živaca u dorzalnog rogu kralježnične moždine gdje inhibira egzocitozu neurotransmitora uključenih u prijenos bolne informacije na drugi neuron u osjetnom putu. Međutim, potrebno je istražiti je li ono segmentalno ili BT-A djeluje na perifernu bol i nakon primjene u više regije središnjeg živčanog sustava (supraspinalno). Stoga je cilj ovog rada ispitati antinociceptivan učinak BT-A nakon primjene u moždane komore (i.c.v.) ili cisternu magnu (i.c.) na dva modela upalne boli. Jedan je periferni formalinski test u području inervacije ishijadičnog živca, dok je drugi orofacijalni formalinski test u području inervacije trigeminalnog živca.

Ispitivanje je provedeno na mužjacima štakora soja Wistar, starim 3-4 mjeseca, na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta (u okviru postojećih odobrenih projekata). BT-A (1 i.j./kg) je primijenjen i.c.v. i i.c. kod formalinskog testa na šapi, a kod orofacijalnog testa primijenjen je i.c.

Supraspinalno primijenjen BT-A nije smanjio bol u prvoj (akutnoj) niti u drugoj (upalnoj) fazi formalinskog testa na šapi, dok je primijenjen i.c. smanjio bol u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa.

Dobiveni rezultati pokazuju da BT-A primijenjen supraspinalno ne djeluje na bol na periferiji, iako je paralelnim istraživanjima njegove distribucije u regijama mozga nakon i.c.v. ili i.c. primjene pokazano da putuje u nocicepcijske regije mozga (potvrđeno kroz prisutnost pocijepanog supstrata SNAP-25 imunohistokemijskom metodom). Uzimajući u obzir i rezultate prethodnih istraživanja rezultati ovog diplomskog rada dodatni su dokaz da se antinociceptivno djelovanje BT-A odvija segmentalno na razini kralježnične moždine.

## SUMMARY

Botulinum toxin (BT-A) is the most potent known toxin and at the same time a pharmacologically useful protein that has a wide clinical application. Animal studies and clinical studies have shown long-term antinociceptive activity of BT-A in some chronic pain states, but the mechanism of action has not yet been clarified. For a long time, the analgesic effect was considered to be at the peripheral level by inhibition of the exocytosis of the neurotransmitters involved in nociception. However, a growing number of evidence suggests that after peripheral administration BT-A enters the neuron and through axonal transport comes to the central nerve endings in the dorsal horn of the spinal cord, where he inhibits the exocytosis of the neurotransmitters involved in transferring the painful information to the next neuron in the pain pathway, but it is still necessary to investigate whether this happens segmentally in spinal cord or the antinociceptive mechanism also takes place on supraspinal level.

The purpose of this study is to investigate the antinociceptive effect of BT-A after its application in brain chambers or in cisterna magna on two pain models. One of them is formalin-induced pain model that takes place on area innervated by ischiadic nerve, while the other is orofacial formalin-induced pain model conducted on area innervated by trigeminal nerve.

This study was performed on male Wistar rats that were 3-4 months old, at Department of Pharmacology of the Faculty of Medicine (as part of current approved projects). In the formalin test on the rat hind-paw BT-A (1 i.j./kg) was administered i.c.v. and i.c. In orofacial test BT-A was applied i.c.

The supraspinally applied BT-A neither reduced pain in the first (acute) phase, nor in the second (inflammatory) phase of the formalin test performed on the rats hind-paw, while BT-A applied i.c. reduced pain in the second phase of the orofacial formalin test.

The obtained results show that BT-A, when administered supraspinally, does not have analgesic effect on peripheral pain although it travels to the nociceptive regions of the brain which is proved by presence of cleaved substrate, SNAP-25. Taking into account the results of previous researches the results of this study are additional evidence that the antinociceptive activity of BT-A takes place segmentally at the spinal cord level.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### ANTINOCICEPTIVNO DJELOVANJE BOTULINUM TOKSINA TIPA A OVISNO O MJESTU PRIMJENE U SREDIŠNJEM ŽIVČANOM SUSTAVU

**Marijana Bunić**

#### SAŽETAK

Botulinum toksin (BT-A) je najpotentniji poznati toksin te istovremeno farmakološki koristan protein koji ima široku kliničku primjenu. Ispitivanja na životinjama te kliničke studije su pokazale dugotrajno antinociceptivno djelovanje BT-A kod nekih kroničnih bolnih stanja, ali mehanizam djelovanja još nije razjašnjen. Dugo vremena se smatralo da se analgetski učinak postiže na perifernoj razini inhibicijom egzocitoze neurotransmitora uključenih u nastajanje bolnog impulsa. No, sve je više dokaza da nakon periferne primjene BT-A ulazi u neuron i putem aksonalnog transporta dolazi do središnjih okončina živaca u dorzalnog rogu kralježnične moždine gdje inhibira egzocitozu neurotransmitora uključenih u prijenos bolne informacije na drugi neuron u osjetnom putu. Međutim, potrebno je istražiti je li ono segmentalno ili BT-A djeluje na perifernu bol i nakon primjene u više regije središnjeg živčanog sustava (supraspinalno). Stoga je cilj ovog rada ispitati antinociceptivan učinak BT-A nakon primjene u moždane komore (i.c.v.) ili cisternu magnu (i.c.) na dva modela upalne boli. Jedan je periferni formalinski test u području inervacije ishijadičnog živca, dok je drugi orofacijalni formalinski test u području inervacije trigeminalnog živca. Ispitivanje je provedeno na mužjacima štakora soja Wistar, starim 3-4 mjeseca, na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta (u okviru postojećih odobrenih projekata). BT-A (1 i.j./kg) je primijenjen i.c.v. i i.c. kod formalinskog testa na šapi, a kod orofacijalnog testa primijenjen je i.c. Supraspinalno primijenjen BT-A nije smanjio bol u prvoj (akutnoj) niti u drugoj (upalnoj) fazi formalinskog testa na šapi, dok je primijenjen i.c. smanjio bol u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa. Dobiveni rezultati pokazuju da BT-A primijenjen supraspinalno ne djeluje na bol na periferiji, iako je paralelnim istraživanjima njegove distribucije u regijama mozga nakon i.c.v. ili i.c. primjene pokazano da putuje u nocicepcijske regije mozga (potvrđeno kroz prisutnost pocijepanog supstrata SNAP-25 imunohistokemijskom metodom). Uzimajući u obzir i rezultate prethodnih istraživanja da BT-A smanjuje bol na periferiji ako se primijeni intratekano, rezultati ovog diplomskog rada dodatni su dokaz da se antinociceptivno djelovanje BT-A odvija segmentalno na razini kralježnične moždine.

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

Rad sadrži: 34 stranica, 5 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 65 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Botulinum toksin tipa A, bol, središnji živčani sustav

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

Ocjenjivači: **Izv. prof. dr. sc., Lidija Bach Rojecky**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

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

**Izv. prof. dr. sc., Anita Hafner**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj, 2017.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### ANTINOCICEPTIVE ACTION OF BOTULINUM TOXIN TYPE A REGARDING THE PLACE OF APPLICATION IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

**Marijana Bunić**

#### SUMMARY

Botulinum toxin (BT-A) is the most potent known toxin and at the same time a pharmacologically useful protein that has a wide clinical application. Animal studies and clinical studies have shown long-term antinociceptive activity of BT-A in some chronic pain states, but the mechanism of action has not yet been clarified. For a long time, the analgesic effect was considered to be at the peripheral level by inhibition of the exocytosis of the neurotransmitters involved in nociception. However, a growing number of evidence suggests that after peripheral administration BT-A enters the neuron and through axonal transport comes to the central nerve endings in the dorsal horn of the spinal cord, where he inhibits the exocytosis of the neurotransmitters involved in transferring the painful information to the next neuron in the pain pathway, but it is still necessary to investigate whether this happens segmentally in spinal cord or the antinociceptive mechanism also takes place on supraspinal level. The purpose of this study is to investigate the antinociceptive effect of BT-A after its application in brain chambers or in cisterna magna on two pain models. One of them is formalin-induced pain model that takes place on area innervated by ischiadic nerve, while the other is orofacial formalin-induced pain model conducted on area innervated by trigeminal nerve. This study was performed on male Wistar rats that were 3-4 months old, at Department of Pharmacology of the Faculty of Medicine (as part of current approved projects). In the formalin test on the rat hind-paw BT-A (1 i.j./kg) was administered i.c.v. and i.c. In orofacial test BT-A was applied i.c. The supraspinally applied BT-A neither reduced pain in the first (acute) phase, nor in the second (inflammatory) phase of the formalin test performed on the rats hind-paw, while BT-A applied i.c. reduced pain in the second phase of the orofacial formalin test. The obtained results show that BT-A, when administered supraspinally, does not have analgesic effect on peripheral pain although it travels to the nociceptive regions of the brain which is proved by presence of cleaved substrate, SNAP-25. Taking into account the results of previous researches the results of this study are additional evidence that the antinociceptive activity of BT-A takes place segmentally at the spinal cord level.

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

Thesis includes: 34 pages, 5 figures, 1 table and 65 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Botulinum toxin type A, pain, central nervous system

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

Reviewers: **Lidija Bach-Rojecky, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Živka Juričić, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Anita Hafner, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July, 2017.