

# Utjecaj botulinum toksina tipa A na aktivaciju neurona leđne moždine u modelu upalne boli

---

Meglić, Valentina

Master's thesis / Diplomski rad

2022

*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:163:580284>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-05**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Valentina Meglič**

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

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

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

*Od srca zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Lidiji Bach-Rojecky na pomoći i strpljenju prilikom izrade ovog diplomskog rada, kao i na svom prenesenom znanju tijekom studija.*

*Također se iskreno zahvaljujem asistentici Daliji Vađunec na nesebičnoj pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela rada i obrade dobivenih rezultata.*

*Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima koji su mi uvijek bili oslonac i pružili bezuvjetnu podršku kroz školovanje. Bez vas ovo ne bi bilo moguće.*

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Botulinum toksin .....	1
1.1.1. Podrijetlo .....	1
1.1.2. Botulizam .....	3
1.1.3. Struktura .....	4
1.1.4. Mehanizam djelovanja .....	5
1.1.5. Klinička primjena .....	9
1.1.6. Analgetski učinak botulinum toksina tipa A .....	12
1.2. Bol .....	14
1.2.1. Vrste boli i njihove značajke .....	14
1.2.3. Neurotransmitori pri nocicepciji .....	21
1.2.4. Modulacija nocicepcije .....	23
1.2.5. Senzitivizacija i mehanizmi njezina nastanka .....	24
1.3. Životinjski eksperimentalni modeli boli.....	25
1.3.1. Karagenanski test .....	26
1.4. c-Fos .....	27
1.4.1. Struktura i mehanizam djelovanja.....	27
1.4.2. c-Fos kao neuralni marker boli.....	28
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	31
3. MATERIJALI I METODE .....	33
3.1. Životinje i njihovo tkivo za analizu .....	33
3.2. Ispitivana tvar, botulinum toksin tipa A (BT-A) .....	33
3.3. Antitoksin za botulinum toksin tipa A (anti-BT-A) .....	33
3.4. Eksperimentalni model boli: karagenanski test (2%) .....	34
3.5. Eksperimentalni protokol .....	34
3.5.1. Priprema uzoraka za imunohistokemijsku analizu.....	34
3.5.2. Korištene kemikalije, reagensi i protutijela.....	35
3.5.3. Imunohistokemija.....	36
3.6. Statistička analiza rezultata .....	38
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	39
5. ZAKLJUČCI.....	49
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA.....	50

7. LITERATURA .....	52
8. SAŽETAK / SUMMARY.....	56

# 1. UVOD

## 1.1. Botulinum toksin

Prije više od dva stoljeća u Njemačkoj je zabilježen prvi slučaj botulizma. Kontaminirane kobasice smatrane su uzrokom ove, do tada nepoznate bolesti koja je harala Württembergom naredno stoljeće, uzimajući brojne živote. Mladi njemački liječnik Justinus Kerner već je tad predložio kliničku primjenu toksina ekstrahiranog iz kontaminiranih kobasica. Unatoč tome, prva klinička primjena botulinum toksina seže u 1977., kada ga je dr. Alan Scott primijenio u određene mišiće oko očiju pacijenta s ciljem terapije strabizma. Od tad su provedena brojna istraživanja o djelovanju i mogućoj primjeni ovog toksina koja su rezultirala ne samo novim formulacijama za njegovu terapijsku upotrebu, već i širokom lepezom područja moguće primjene, od neurologije do kozmetičkih zahvata (Choudhury i sur., 2021).

### 1.1.1. Podrijetlo

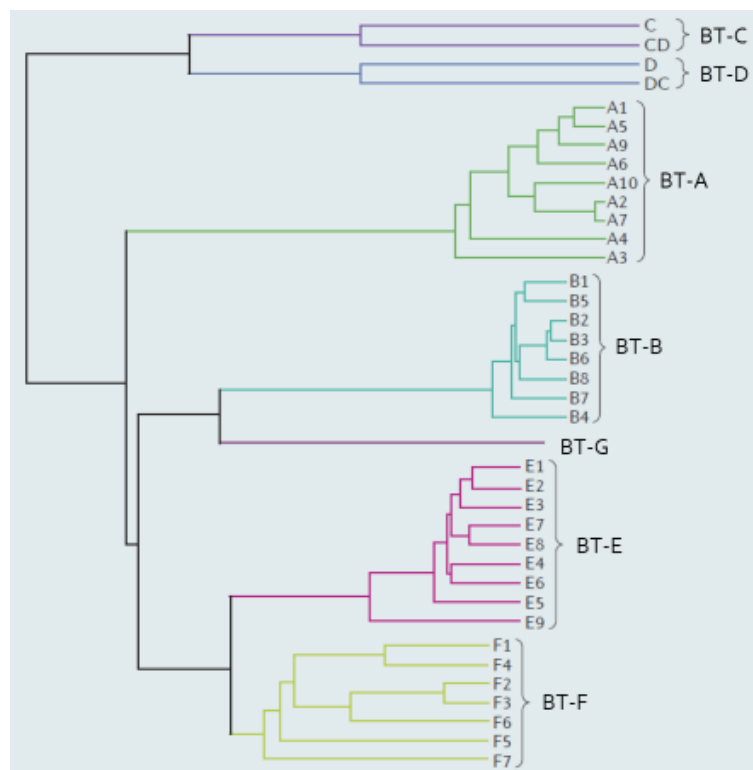
Botulinum toksini su proteini s karakterističnom neurotoksičnošću koje proizvode bakterije roda *Clostridium* (Choudhury i sur., 2021). *Clostridium* je rod anaerobnih štapićastih Gram pozitivnih bakterija koje mogu stvarati spore. Uključuju više od 150 vrsta, a u prirodi su široko rasprostranjene u tlu te sedimentima jezera i oceana, ali i u crijevima životinja gdje preživljavaju u obliku spora. Spore mogu preživjeti dugo vremensko razdoblje u ekstremnim fizičkim i kemijskim uvjetima. Kada okolišni uvjeti postanu povoljni (poput vlažnosti, prisutnosti nutrijenata i odsutnosti kisika), spore prelaze u vegetativne stanice koje mogu stvoriti kolonije u hrani i proizvesti toksin koji, nakon ingestije, uzrokuje težak oblik trovanja poznat pod nazivom botulizam. Iako je određen broj klostridija patogen, poput *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* i *Clostridium sordelli*, malen broj vrsta je neurotoksičan.

Šest filogenetski različitih klostridijskih grupa (*Clostridium botulinum* grupe I–III, *Clostridium argentinense* i pojedini sojevi *Clostridium baratii* i *Clostridium butyricum*) proizvodi sedam serotipski različitih vrsta botulinum toksina, BT ili BoNT (engl. *Botulinum neurotoxin*): A, B, C, D, E, F, G. Tipovi botulinum toksina određuju se serološkim tipiziranjem, odnosno potpunom neutralizacijom toksina korištenjem homolognog antitoksina. Križna neutralizacija specifičnog toksina heterolognim antitoksinom se ne događa uopće ili je minimalna (Rossetto i sur., 2014). Razmatralo se postojanje dodatnog serotipa H koji je identificiran kao uzročnik dojenačkog botulizma 2014. godine. Nakon provedenih istraživanja pokazalo se da je to kimerni protein između BT-A i BT-F, s obzirom da ga neutralizira tip-A

antitoksin, a sekvencijalnom analizom otkrivena je homologija s BT-F (Choudhury i sur., 2021).

BT tipovi podijeljeni su u subtipove ovisno o njihovom aminokiselinskom slijedu, kodirani su *bont* genima i obilježavaju se numeričkim sufiksom nakon serotipa (Slika 1). Postojanje kimernih neurotoksina, poput BT-H, rezultat je prethodnih rekombinacijskih događaja unutar *bont* gena (Pirazzini i sur., 2017). Serotipovi i subtipovi razlikuju se ne samo u strukturi, već i u toksiko-farmakološkim svojstvima (Choudhury i sur., 2021). Bakterije koje proizvode tipove C i D nisu proteolitičke i imaju sličan metabolički obrazac, dok su kulture koje proizvode tipove A te djelomično B i F toksine proteolitičke. Ostatak bakterija koje proizvode B i F toksine su neproteolitičke s ugljikohidratnim metaboličkim obrascima, po čemu se razlikuju od neproteolitičkih C i D sojeva (<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-17-clostridium-botulinum>).

Iako većina vrsta proizvodi samo jedan tip toksina, posljednjih su godina otkrivene vrste koje mogu aktivno proizvoditi dva ili čak tri tipa toksina (Rossetto i sur., 2014).



**Slika 1.** Filogenetsko stablo različitih serotipova i subtipova botulinum toksina koje proizvode neurotoksične *Clostridium* vrste (prilagođeno prema Rossetto i sur., 2014)

### 1.1.2. Botulizam

Dok tipovi BT-A, BT-B, BT-E i (rjeđe) BT-F uzrokuju botulizam i u životinja i u ljudi, za BT-C i BT-D se smatra kako ne mogu uzrokovati botulizam nakon oralne primjene u čovjeka jer se ne apsorbiraju u crijevima. Bakterije koje proizvode BT-G izolirane su iz tla, ali se smatra kako ne mogu uzrokovati botulizam (Choudhury i sur., 2021).

Iako je ova bolest danas rijetka, uzrokuje izrazito visoku stopu smrtnosti. Najviše slučajeva uzrokovano je tipom A, B (iz mesnih proizvoda) i E (iz plodova mora) unesenima hranom iz konzerviranih namirnica jer one pružaju anaerobne uvjete koji pogoduju ne samo rastu bakterija, već i proizvodnji toksina. Stoga mjere sprečavanja bolesti uključuju toplinsku sterilizaciju (po mogućnosti i uklanjanje svih spora), smanjenje vlage, niski pH te visoku koncentraciju konzervansa poput NaCl ili NaNO<sub>2</sub> (<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-17-clostridium-botulinum>).

Botulizam se ovisno o putu ulaska toksina u organizam dijeli na botulizam uzrokovan hranom, dojenački botulizam, botulizam unesen kroz rane, jatrogeni i inhalacijski botulizam. Prva dva tipa su predominantni oblici bolesti kod kojih se toksin unosi oralnim putem. Ostali su tipovi iznimno rijetki, no kod njih BT zaobilazi crijeva i direktno ulazi u opću cirkulaciju zbog čega je 100 - 1000 puta toksičniji nego kad je unesen oralno (Rossetto i sur., 2014).

Simptomi koji karakteriziraju bolest uključuju paralizu mišića i autonomnog živčanog sustava, neurološke simptome (suhoću usta, dvoslike, ptozu) te bulbarne simptome (poremećaji govora, disfagija, gubitak mimike). Paraliza se prvo uočava na očnim mišićima te potom silazi na mišiće lica i naposljetku respiratornog sustava, uzrokujući respiratorni zastoj. Gastrointestinalni simptomi (mučnina, povraćanje, grčevi u trbuhu i proljev) javljaju se kod botulizma prenesenog hranom te često prethode već opisanim neurološkim simptomima.

Liječenje uključuje mehaničku ventilaciju, primjenu antitoksina i suportivnu terapiju. Kod botulizma prenesenog hranom moguća je i primjena aktivnog ugljena (Pirazzini i sur., 2017; <http://www.msđ-prirucnici.placebo.hr/msđ-prirucnik/infektologija/anaerobne-bakterije/botulizam>).

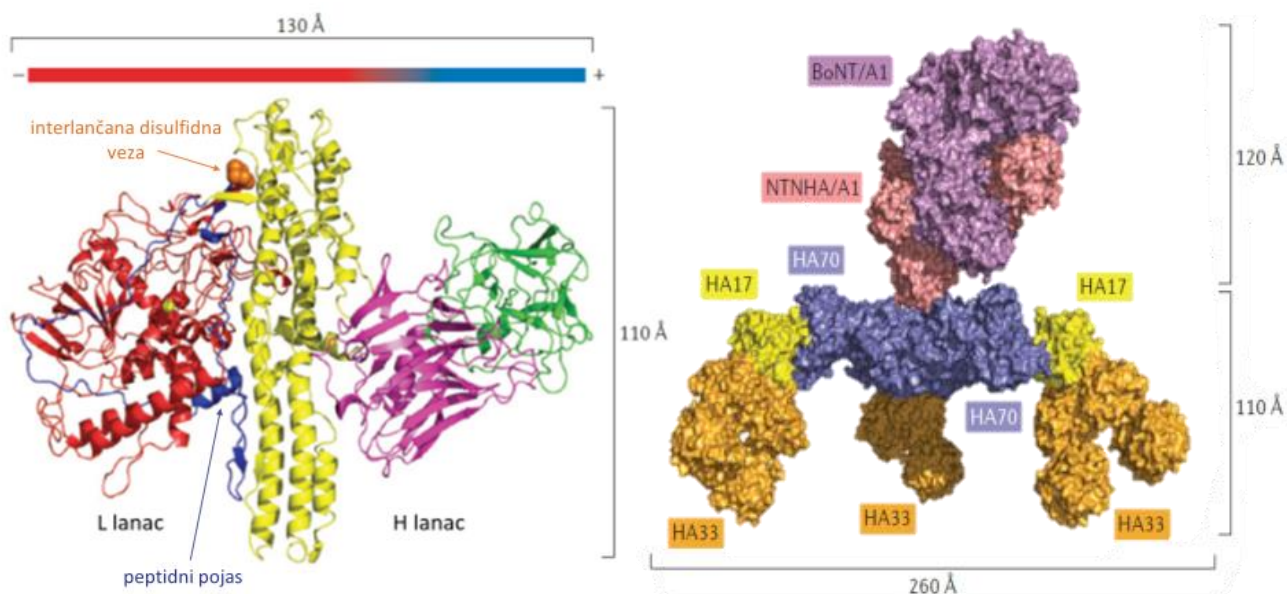


### 1.1.3. Struktura

BT proteini su u početku sintetizirani kao jedan polipeptidni lanac mase približno 150 kDa. Proteaze kidaju taj lanac u području petlje koju stvara disulfidna veza čime nastaje zreli toksin koji se sastoji od lakog (L lanac mase oko 50 kDa) i teškog lanca (H lanac mase oko 100 kDa). Ova dva lanca međusobno su povezana dugačkim peptidnim pojasom (jedinstven za BT, čvrsto spaja L i HN domenu), nekovalentnim vezama i jednom međulančanom disulfidnom vezom. Cijeli protein sastoji se od tri domene koje ispunjavaju različite funkcije na molekularnoj razini (Slika 2.a, 2.c):

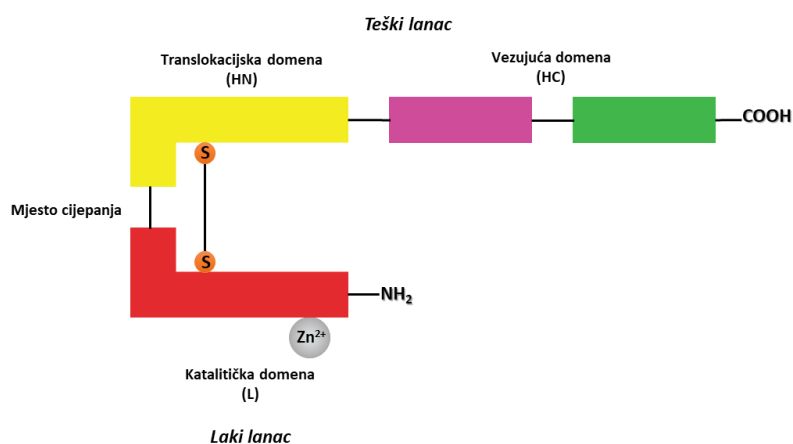
1. L lanac – katalitička jedinica koja sadrži cink; posjeduje toksičnu metaloproteinaznu aktivnost koja specifično kida SNARE proteine (engl. *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) potrebne za egzocitozu neurotransmitora,
2. HN domena – smještena na N kraju teškog lanca; potrebna je za translokaciju lakog lanca preko membrane endocitoznih vezikula u citoplazmu neurona,
3. HC domena – smještena na C kraju teškog lanca; odgovorna je za presinaptičko vezanje na receptore (gangliozide i sinaptičke vezikularne proteine) i endocitozu; sastoji se od dvije poddomene koje su različito smotane i stoga imaju drugačija svojstva vezanja.

Dok su u svih BT prisutna dva lanca povezana disulfidnom vezom, postoje značajne razlike u slijedu aminokiselina kod svakog podtipa. Toksin je obično okružen i stabiliziran netoksičnim proteinima (engl. *neurotoxin associated proteins*, NAPs). U njih spadaju nehemaglutininski i hemaglutininski proteini. S nehemaglutininskim proteinima BT formira heterodimer. Ove proteine koji okružuju toksin kodiraju *ntnha* geni smješteni do *bont* gena, a pretpostavlja se da im je glavna uloga upravo zaštita toksina od proteaza i pH uzrokovane denaturacije u raspadajućem materijalu u kojem klostridije uglavnom žive. Sekundarna uloga im je zaštita od uvjeta u gastrointestinalnom traktu životinja koje inficiraju. Osim nehemaglutininskih proteina, u zaštitu toksina su uključeni i sami hemaglutinini. Iako nemaju direktan kontakt s toksinom, s njim i nehemaglutininima formiraju veliki oligomer poznat kao PTC kompleks mase oko 900 kDa (engl. *progenitor toxin complex* – Slika 2.b). Glavna uloga ovog kompleksa je olakšavanje transepitelne apsorpcije toksina. Iako sam toksin može prijeći barijeru, hemaglutinini djeluju kao adhezini koji olakšavaju prianjanje na mukozu, epitelne i druge stanice crijeva kao što su M i neuroendokrine stanice budući da stupaju u interakcije sa šećerima poput sijalinske kiseline i galaktoze (Rossetto i sur., 2014).



2.a)

2.b)



2.c)

**Slika 2.** Struktura botulinum toksina tipa A: a) kristalna struktura BT-A s pripadajućim električnim dipolom, b) struktura simetričnog heterododekamernog PTC kompleksa koji osim BT-A uključuje nehemaglutinine (NTNHA/A1) te hemaglutinine (tri HA17, šest HA33 i tri HA70), c) shematski prikaz dvolančane strukture BT-A (prilagođeno prema Rossetto i sur., 2014)

### 1.1.4. Mehanizam djelovanja

Zbog porasta pH prilikom ulaska u krvotok PTC se raspada jer se NAP-ovi odvajaju od BT-A koji potom slobodan putuje krvlju i limfatičkim sustavom gdje se intaktan zadržava nekoliko dana. Mehanizam prelaska kroz stijenke krvnih i limfnih žila još uvijek je nepoznat, ali je poznato kako se nakon toga BT selektivno veže za periferne živčane završetke, poglavito autonomnih kolinergičkih živaca i u neuromuskularnoj vezi (Kim i sur., 2015). Signalizacija u kemijskim sinapsama posredovana je neurotransmitorima koji se otpuštaju iz presinaptičkih živčanih završetaka i vežu na receptore smještene na postsinaptičkoj stanici poput mišićne ili egzokrine. Kod završne motoričke ploče, koja kao poveznica motoričkog

neurona i mišićnog vlakna omogućuje kontrakciju skeletnih mišića, acetilkolin (ACh) se otpušta sa završetaka motoričkih aksona kada akcijski potencijal, generiran u početnom dijelu motoričkog neurona u središnjem živčanom sustavu (SŽS-u) doputuje do živčanog završetka. Odnosno, neurotransmitori, pa tako i acetilkolin, sintetiziraju se u citoplazmi živčane stanice i pohranjuju u presinaptičkim živčanim završetcima unutar malih sinaptičkih vezikula. Nakupljanje ACh u njihovom lumenu primarno je potaknuto elektrokemijskim protonskim gradijentom kojeg stvaraju protonske crpke smještene na membrani vezikula. Crpke su odgovorne za prijenos vodikovih iona u sam sinaptički mjehurić koristeći energiju stvorenu hidrolizom ATP-a. Tako sinaptičke vezikule služe kao rezervoar ACh u presinaptičkim živčanim završetcima ili se vežu za aktivne zone, odnosno specijalizirana područja presinaptičke membrane u procesu spajanja (engl. *docking*). Velik broj proteina regulira privlačenje (engl. *docking*): integralni proteini membrana vezikule VAMP (engl. *vesicle-associated membrane protein* ili sinaptobrevin) i sinaptotagmin (Syt), proteini presinaptičke neuronalne membrane SNAP-25 i sintaksin te citoplazmatski proteini poput kompleksina i Munc18. Syt stupa u interakciju s membranskim inozitolnim fosfolipidima dok VAMP formira zavojiti kompleks sa SNAP-25 i sintaksinom. Nastanak ovog kompleksa, poznatijeg kao SNARE kompleks (engl. *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor activating protein receptor*) regulira Munc18. Kompleksin sprečava potpuno stapanje membrana vezikule i stanice sve dok SNARE proteini ne odrade svoje funkcije u procesu poznatom kao sazrijevanje vezikule (engl. *priming*). Depolarizacija presinaptičkih završetaka uzrokovana akcijskim potencijalom rezultira otvaranjem kalcijevih ionskih kanala. Inluks  $Ca^{2+}$  u citoplazmu presinaptičkog neurona odgovoran je za otpuštanje neurotransmitora iz vezikula nakon vezanja za Syt. Ovo početno spajanje vodi k brzom konformacijskoj promjeni koja omogućuje potpunu fuziju i formaciju pora kroz koje neurotransmitor brzo izlazi u neuromuskularnu sinaptičku pukotinu. Ovdje se ACh veže za specifične ionotropne receptore na mišićnom vlaknu, nikotinske kolinergičke receptore koje aktivira dovodeći do ulaska natrijevih iona u stanicu zbog čega se postsinaptička membrana depolarizira. To dovodi do inluksa  $Ca^{2+}$  i posljedično kontrakcije mišića. Nakon otpuštanja ACh vezikul se internalizira endocitozom posredovanom klatrinom. Egzocitoza i endocitoza neurotransmitora strogo je uparena: inhibicija jednog procesa rezultira inhibicijom drugog. Poslije internalizacije vezikule se ponovno pune molekulama neurotransmitora čime započinje sljedeći ciklus neurotransmisije.

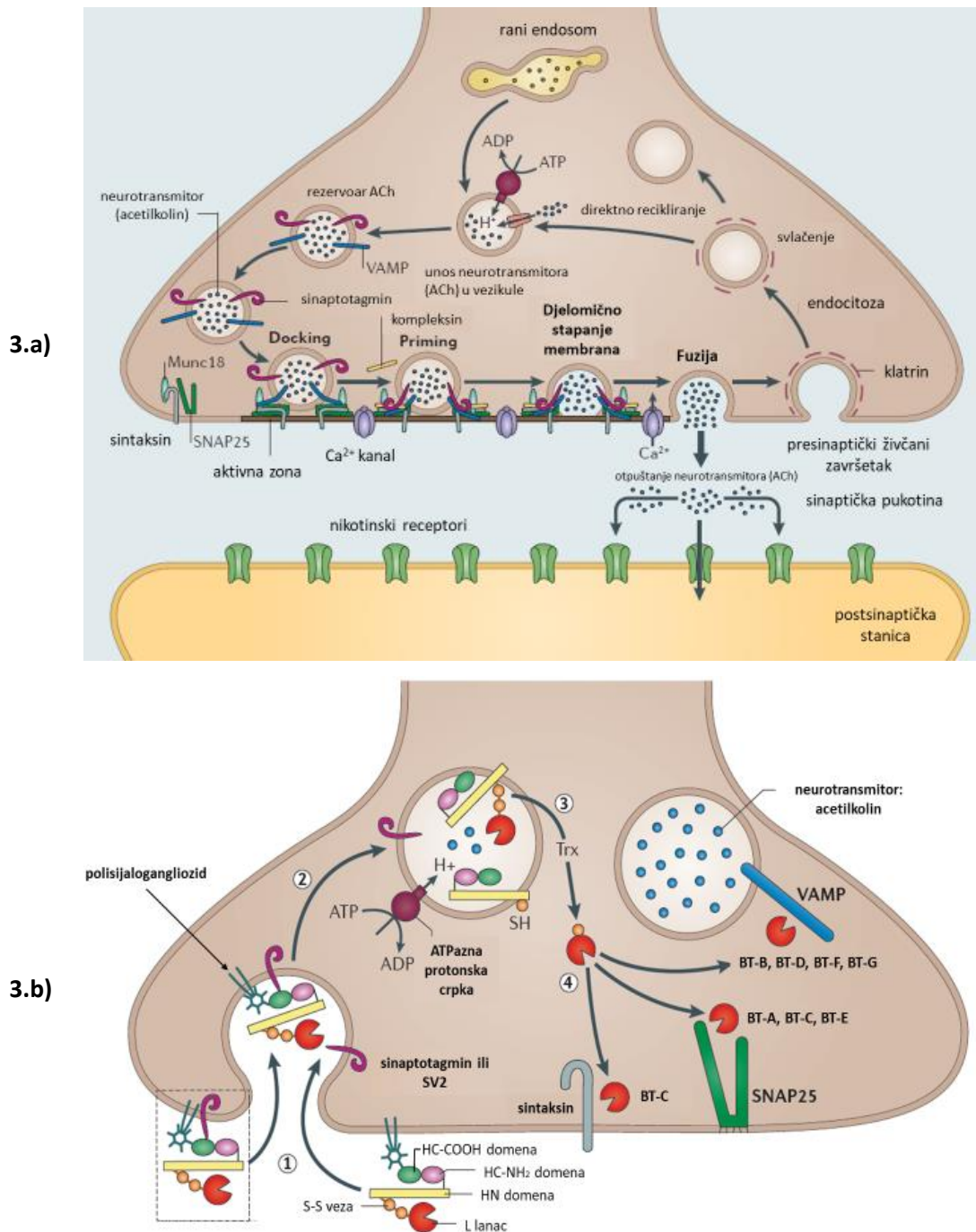
Botulinum toksin djeluje tako da dugotrajno no reverzibilno sprečava otpuštanje acetilkolina, što rezultira blokadom kontrakcije skeletnih mišića iako akcijski potencijali i dalje dolaze do

završne motoričke ploče. Toksin se internalizira u stanicu na jedinstven način - dualnim vezanjem na međusobno neovisne receptore. Posredstvom HC domene toksin se veže na polisijalogangliozid te potom na površinski receptor sinaptotagmin ili glikozilirani SV2 (engl. *Synaptic vesicle glycoprotein*). Na koji će se površinski receptor toksin vezati ovisi o njegovu tipu pa će se primjerice BT-A vezati na SV2 receptor. Toksin se potom internalizira endocitozom te smješta unutar sinaptičkih vezikula koje zakiseljuje poticanjem pojačanog rada vezikularne protonske pumpe. Snižen pH aktivira ACh transportere u membrani vezikula pa se citoplazmatski ACh pojačano unosi i koncentrira u vezikulama. Kao što je prethodno opisano, vezikule se normalno spajaju s presinaptičkom membranom i otpuštaju ACh u sinaptičku pukotinu, no prisustvo BT interferira s ovim procesom na sljedeći način (Slika 3): potpomognut HN domenom teškog lanca odvija se proces translokacije. On uključuje ugradnju toksina u membranu endosoma i translokaciju lakog lanca s luminalne na citoplazmatsku površinu membrane endosoma. Laki lanac ostaje neaktivan sve dok je vezan za ostatak toksina. Nakon translokacije slijedi otpuštanje i aktivacija lakog lanca redukcijom disulfidne veze pomoću cijepajućih enzima kao što su proteini toplinskog šoka hsp90 i tioredoksin reduktaza-tioredoksin sustav (TrxR-Trx). Metaloproteaznom aktivnošću laki lanac potom kida i inaktivira proteine kao što su SNAP-25 i sintaksin. Uništavanjem funkcije ovih SNARE proteina BT onemogućuje fuziju vezikule s presinaptičkom membranom i posljedično otpuštanje ACh u sinaptičku pukotinu što rezultira kemijskom paralizom mišića. Vremensko trajanje paralize ovisi primarno o poluvremenu života lakog lanca i dostupnosti SNARE proteina za kidanje, ali i o aktivnosti zahvaćenih mišića i dozi toksina. Koji protein će biti pokidan ovisi o tipu BT: tipovi B, D, F i G kidaju VAMP, tipovi A i E kidaju SNAP-25, a tip C kida SNAP-25 ili sintaksin.

Kao što je ranije spomenuto, neuromuskularna veza, iako najčešće, nije jedino mjesto djelovanja BT, odnosno vezikule s ACh nisu jedine čiju egzocitozu BT onemogućuju. Ostale mete uključuju molekule u malim sinaptičkim vezikulama (kao što je glutamat) i neuropeptide u velikim vezikulama s gustom jezgrom (CGRP, PACAP, tvar P).

Neuromuskularna veza pogođena djelovanjem BT prolazi opsežno remodeliranje zbog čega je učinak toksina reverzibilan. Zahvaćeni mišić i mišićna vlakna postupno atrofiraju, dok se završna motorička ploča povećava. Kako bi se održala homeostaza, neuroni stvaranju nove živčane ogranke (uglavnom iz završetaka nemijeliniziranih motoričkih aksona) koji sadrže proteine uključene u proces neuroegzocitoze, preuzimajući funkciju zahvaćene motoričke ploče. Ogranci se postupno povećavaju, protežući se paralelno s longitudinalnom osi mišićnog vlakna. Formiraju se i nove sinapse (koje su ipak slabije djelotvorne od originalnih) te novi

kontakti s mišićnim vlaknima. Na postsinaptičkim membranama također dolazi do reorganizacije nikotinskih receptora koji su sada smješteni nasuprot novostvorenim funkcionalnim ograncima. Pritom se povećava broj motoričkih ploča na jednom mišićnom vlaknu, kao i broj vlakana inerviranih jednim motoričkim aksonom. Kada se donekle povrati funkcija glavnog ogranka neurona, novostvoreni ogranci i sinapse budu eliminirani (Bach-Rojecky, 2006; Rossetto i sur., 2014; Pirazzini i sur., 2017; Choudhury, 2021).



**Slika 3.** Mehanizam djelovanja botulinum toksina: a) normalno otpuštanje neurotransmitora, b) utjecaj različitih tipova BT na otpuštanje neurotransmitora iz presinaptičkog neurona (prilagođeno prema Rossetto i sur., 2014)

### 1.1.5. Klinička primjena

Nakon Scottovih pionirskih istraživanja u području oftalmologije, ideja o korištenju niskih doza BT u terapijske svrhe nastavila se razvijati zahvaljujući identifikaciji i pročišćavanju različitih serotipova toksina početkom 20. stoljeća, pretkliničkim testiranjima na primatima 1960.-tih te karakterizacijom genoma *C. botulinum* 1987. godine. Rezultat kliničkih opažanja i istraživanja bilo je odobravanje primjene niskih doza BT-A u liječenju strabizma, a zatim i blefarospazma te hemifacijalnog spazma od strane američke Agencije za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) 1989. godine (Bach-Rojecky, 2006; Drinovac Vlah, 2017).

Apsolutna neurospecifičnost omogućila je korištenje BT-A kao učinkovitog terapijskog sredstva za bolesti karakterizirane hiperfunkcijom živčanih završetaka koju regulira lokalna injekcijska primjena malenih količina toksina (Rossetto i sur., 2014).

Stoga je BT-A postao terapijska opcija u neurologiji, prvotno za olakšavanje već spomenutih hiperkontrakcija malih mišića vjeđa i lica, kao i većih fokalnih distonija mišića glave i vrata (cervikalna i oromandibularna distonija), a potom i za liječenje poremećaja kretnji udova kao što su okupacijska distonija, spastičnost mišića različite etiologije i cerebralna paraliza. S obzirom da BT-A također djeluje na kolinergičnu autonomnu inervaciju koja kontrolira znojenje, suzne žlijezde i žlijezde slinovnice te glatke mišiće i sfinktere, indikacije za BT-A proširene su na hiperhidrozu te urološke i gastrointestinalne poremećaje. Miorelaksirajuće djelovanje povezano s analgetskim učinkom BT-A1 primjenjuje se i u terapiji različitih bolnih stanja poput migrene. Unatoč službenom odobrenju u tek desetak indikacija, BT se danas široko koristi „*off-label*“, odnosno izvan indikacijskog područja (Tablica 1). Danas je jedan od najčešće korištenih terapijskih proteina s obzirom da se, osim za liječenje, od 2002. koristi i u kozmetici za tretiranje bora, po čemu je i najpoznatiji širokoj javnosti (Bach-Rojecky, 2006; Pirazzini i sur., 2017; Drinovac Vlah, 2017).

Poželjna farmakološka svojstva BT-A uključuju njegovu potentnost, neurospecifičnost, ograničenu difuziju s mjesta lokalne primjene i reverzibilnost učinka s vremenom (Pirazzini i sur., 2017). Ostale prednosti upotrebe BT-A u liječenju uključuju dobru suradljivost pacijenata te dokaze o učinkovitosti iz dvostruko slijepih, placebo kontroliranih studija. Nasuprot tome, nedostaci primjene uključuju cijenu terapije, odgođenost maksimalnog učinka u trajanju do mjesec dana, moguć razvoj rezistencije uslijed stvaranja protutijela, rizik od učinaka na mjestima udaljenima od mjesta injiciranja te s tim povezane nuspojave (Elovic i sur., 2009).

Od svih sedam serotipova botulinum toksina, za sada se u terapiji koriste samo dva: tip A i tip B. Potentnost im je izražena u internacionalnim jedinicama (i.j.). 1 i.j. odgovara 0,048 ng BT-A (Bach-Rojecky, 2006).

**Tablica 1.** Popis kliničkih stanja u kojima se primjenjuje BT-A (preuzeto iz Drinovac Vlah, 2017)

ŽIVČANO-MIŠIĆNA SPOJNICA	AUTONOMNE SINAPSE	SENZORNE SINAPSE
<b>ODOBRENA PRIMJENA:</b>		
strabizam (1989.); blefarospazam (1989.); hemifacijalni spazam (1990.); cervikalna distonija (2002.); spazam mišića gornjih (2010.) i donjih (2016.) ekstremiteta kod djece s cerebralnom paralizom i kod odraslih nakon moždanog udara; kozmetička primjena: glabelarne linije i lateralne kantalne bore (2002.)	primarna aksilarna hiperhidroza (2010.); urinarna inkontinencija s prekomjernom neurogenom aktivnošću <i>m. detrusora</i> (2011.); pretjerano aktivan mokraćni mjehur (2011.)	prevencija kronične migrene (2010.)
<b>„OFF-LABEL“ PRIMJENA I U FAZI ISPITIVANJA:</b>		
ostale fokalne distonije: laringealna, oromandibularna, orolingualna, distonije trupa i udova, profesionalne („ <i>writer's cramp</i> “); spastičnost udova kod multiple skleroze i ozljeda SŽS; esencijalni tremor ruku i glave; sindrom ukočene osobe; bruksizam; poremećaji glatkih mišića: benigna hiperplazija prostate, disinergija mišića zdjelice, ahalazija, analna fisura, disfunkcija oddijevog sfinktera, Raynoudov fenomen; kozmetička primjena: hipertrofične bore platizme	palmarna hiperhidroza; Freyjev sindrom; hipersalivacija; hiperlakrimacija; sijaloreja	križobolja; miofascijalni bolni sindrom; piriformis sindrom; kompleksni regionalni bolni sindrom (CPRS); tenzijska glavobolja; glavobolja kao posljedica prekomjerne primjene lijekova; lateralni epikondilitis; osteoartritis; bol u ramenima; fantomska i rezidualna bol; neuropatska bol: trigeminalna, postherpetička i dijabetička neuropatija; visceralna bol: kronična bol zdjelice, prostate i mokraćnog mjehura (intersticijski cistitis)

FDA je registrirao tri formulacije BT-A:

- Onabotulinum toxin A (ONA; Botox®/Vistabel®; Allergan Inc., Dublin, Irska) - kompleks veličine 900 kDa,
- Abobotulinum toxin A (ABO; Dysport®/Azzalure®; Ipsen, Paris, Francuska) - kompleks veličine 900 kDa,
- Incobotulinum toxin A (INCO; Xeomin®/Bocouture®; Merz Pharmaceuticals GmbH, Frankfurt, Njemačka) - 150 kDa biološki aktivni dio kompleksa.

Registrirani pripravak BT-B1 je rimabotulinumtoxin B, Myoblock®/Neurobloc® (Drinovac Vlah, 2017; Radoš Filipović, 2019).

U fazi istraživanja su još rekombinantni proteini sa selektivnim djelovanjem na nociceptivne neurone i proteini kojima je cilj poboljšati farmakodinamička i farmakokinetička svojstva pojedinih serotipova (primjerice kimerni protein BT-E / BT-A kojim je moguće postići brže i dugotrajnije djelovanje u odnosu na BT-A). Istražuju se i male izmjene u strukturi toksina kojima se pokušavaju izbjeći nuspojave vezane uz moguće širenje toksina s mjesta primjene te formulacije transdermalnih oblika kojima bi se omogućio neinvazivan put primjene (Drinovac Vlah, 2017).

Razlike između BT-A i BT-B postoje u potentnosti, trajanju djelovanja, učestalosti nuspojava i antigenosti. U odnosu na BT-A, djelovanje BT-B nastupa prije, ali ujedno traje kraće uz veći broj zabilježenih nuspojava. Potrebne doze BT-B također su nekoliko puta veće od doza BT-A. Osim razlika među tipovima BT, postoje i razlike između različitih komercijalnih pripravaka BT-A (Bach-Rojecky, 2006).

Te razlike proistječu iz razlika u proizvodnom procesu tijekom kojeg se može smanjiti aktivnost aktivnog dijela toksina. Tako je u kliničkim studijama utvrđeno da jednoj jedinici Botox®-a odgovara jedna jedinica Xeomin®-a, a tri jedinice Dysport®-a (Drinovac Vlah, 2017).

U Hrvatskoj su trenutno odobreni Botox Allergan® (BT-A, Allergan Pharmaceuticals Ireland), NUCEIVA® (BT-A, Evolus Pharma B.V.), Vistabel 4 Allergan (BT-A, Allergan Pharmaceuticals Ireland), NeuroBloc (BT-B, Sloan Pharma S.a.r.l), Bocouture (BT-A koji ne sadrži proteinske komplekse, Merz Pharmaceuticals) i Xeomin (BT-A koji ne sadrži proteinske komplekse, Merz Pharmaceuticals) (<https://mediately.co/hr>).



### 1.1.6. Analgetski učinak botulinum toksina tipa A

Zajedno s očekivanim neuromuskularnim učincima uočeno je povoljno djelovanje BT-A na bol povezanu s poremećajem hiperaktivnosti mišića (najprije u bolesnika s cervikalnom distonijom), a smatralo se posljedicom smanjene mišićne kontrakcije. Međutim, daljnjim kliničkim opažanjima uočeno je da analgetsko djelovanje nastupa prije i traje dulje od miorelaksirajućeg te da BT-A može smanjiti bol koja nije praćena povećanom mišićnom kontrakcijom, poput migrene, tenzijske glavobolje i neuropatske boli. To je dovelo do zaključka da je učinak BT-A na bol neovisan o učinku na mišiće te da je vjerojatno posljedica izravnog djelovanja BT-A na senzorne neurone čime utječe na nocicepciju te perifernu i središnju senzitivaciju (Kim i sur., 2015, Drinovac Vlah, 2017).

Prema „perifernoj hipotezi“, predloženi mehanizam antinociceptivnog učinka BT-A nakon lokalnog injiciranja je djelovanje isključivo na perifernim završecima primarnih aferentnih neurona inhibicijom lučenja neurotransmitora i neuropeptida zbog cijepanja SNAP-25, slično prethodno opisanom procesu inhibicije otpuštanja ACh u neuromuskularnoj vezi. Druga mogućnost je utjecaj na prisutnost ionskih kanala ili receptora na membranama perifernih nociceptora. Ovim procesima smanjuje se periferna i posredno središnja senzitivacija. U prilog ovoj hipotezi ide eksperimentalno pokazano inhibirajuće djelovanje BT-A na lučenje brojnih neurotransmitora i neuropeptida uključenih u proces nocicepcije *in vitro* i *in vivo*, kao što su glutamat, tvar P, CGRP (engl. *calcitonin gene related peptide*) i noradrenalin. Prvi dokaz o antinociceptivnom djelovanju BT-A dobiven je na formalinskom modelu upalne boli u štakora. Periferno primijenjen BT-A u plantarnu površinu šape štakora inhibirao je neke od neurofizioloških i neurokemijskih učinaka formalina, kao što su ekspresija c-Fos proteina u leđnoj moždini, aktivacija neurona u dorzalnim rogovima leđne moždine štakora i periferno lučenje glutamata. S obzirom da glutamat sudjeluje u senzitivaciji nociceptora, inhibicija njegovog lučenja smanjuje upalu i perifernu senzitivaciju čime je indirektno smanjena i središnja senzitivacija. Također, u eksperimentalnim modelima upalne boli mokraćnog mjehura smatralo se da je povoljno djelovanje BT-A posljedica smanjenja senzitivacije perifernih aferentnih vlakana, vjerojatno uslijed inhibicije lokalnog lučenja acetilkolina, ATP-a i tvari P te smanjenja ekspresije receptora za kapsaicin i ATP (Bach-Rojecky, 2006; Drinovac Vlah, 2017).

Međutim, teorijom o isključivo perifernom mjestu djelovanja nije moguće objasniti pojave poput udaljenih učinaka BT-A nakon periferne primjene, brži početak djelovanja i učinkovitost nižih doza BT-A nakon intraneuronalne ili središnje intratekalne primjene te

kliničku učinkovitost u bolnim poremećajima poput migrene, koja je definirana kao bolest središnjeg živčanog sustava (SŽS). Stoga je postavljena hipoteza o središnjem mjestu antinociceptivnog djelovanja BT-A te je dokazano da BT-A s mjesta primjene u SŽS dolazi mikrotubulima posredovanim retrogradnim aksonalnim transportom (Bach-Rojecky i Lacković, 2009; Drinovac Vlah, 2017). Iako mehanizam središnje modulacije senzitivacije pomoću BT-A nije u potpunosti razjašnjen, postoji poveznica s endogenim opioidnim i GABA-ergičnim sustavom. Antagonist GABA-A receptora bikukulin, injiciran intraperitonealno i intratekalno, spriječio je učinak smanjenja bolne preosjetljivosti nakon periferne primjene BT-A u štakora. Slično ovim istraživanjima, naloksozanin i naltrekson, selektivni i neselektivni antagonisti  $\mu$ -opioidnih receptora, prevenirali su antinociceptivnu aktivnost BT-A u formalinskom testu, kao i na modelima neuropatske boli. Rezultati ovih istraživanja sugerirali su također da BT-A djeluje na bol na razini leđne moždine (segmentalno) umjesto supraspinalno, budući da primjena bikukulina i opioidnih antagonista u *cisternu magnu* ili moždane komore nije utjecala na antinociceptivno djelovanje periferno primijenjenog BT-A (Kim i sur., 2015; Drinovac Vlah, 2017).

U kliničkim studijama uočeno je smanjenje boli nakon jednokratne intramuskularne i/ili intradermalne lokalne primjene malih doza BT-A (ukupno 7,5 – 10 ng; 0,24 ng na jedno mjesto injiciranja intramuskularno, a 1,45 – 3 ng intradermalno). Dugotrajnost analgezije (čak do 6 mjeseci) smatra se posljedicom dugotrajnog zadržavanja proteolitički aktivnog lakog lanca BT-A u citoplazmi i njegove otpornosti na proteosomalnu razgradnju, a ujedno je i poželjno svojstvo analgetika.

Za neka bolna stanja postoje randomizirane, dvostruko-slijepo, placebom kontrolirane studije, no njihovi su rezultati često kontradiktorni. Uz malen broj studija te malen broj pacijenata koji u njima sudjeluju, kao razlozi kontradiktornih ili negativnih rezultata navode se nedostatak standardiziranih smjernica za primjenu i doziranje BT-A, razlike u metodologiji procjene boli u pacijenata te razlike u definiranju primarnih ishoda studije. Zaključci ovih studija upućuju na to da BT-A nema utjecaja na akutnu i nocicepcijsku bol, no da smanjuje bolnu hiperosjetljivost koja je posljedica ozljede tkiva i/ili živčanog sustava. Najviše kliničkih dokaza govori u prilog uspješnosti BT-A u liječenju trigeminalne neuralgije, dijabetičke neuropatije te postherpetičke neuralgije, a jedina odobrena abolna indikacija za primjenu BT-A je kronična migrena (Matak i sur., 2019).

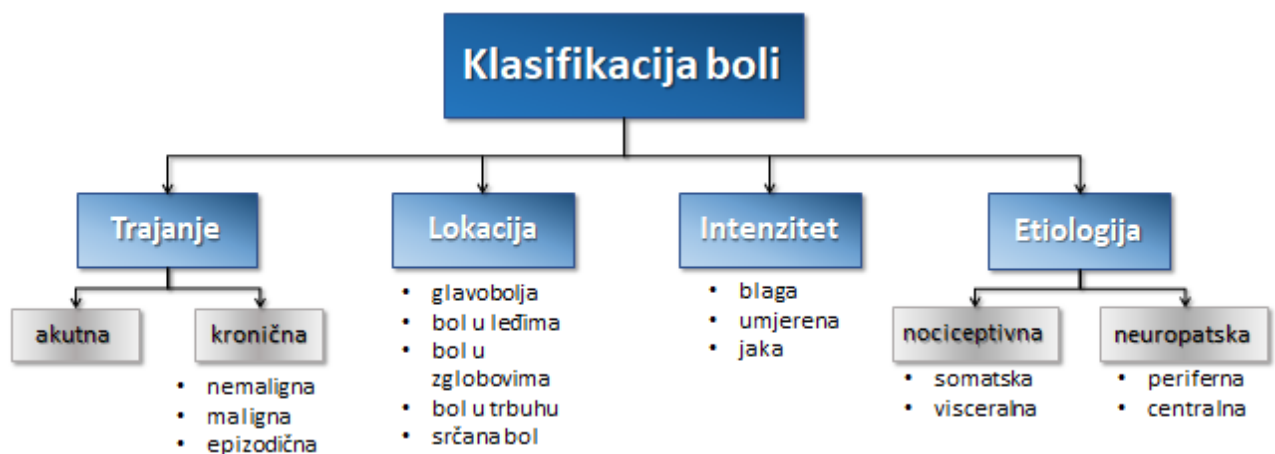
## 1.2. Bol

Prema definiciji Međunarodne udruge za istraživanje boli (engl. *International Association for the Study of Pain*, IASP), bol je neugodan osjetilni i emocionalni doživljaj koji ukazuje na ili je povezan sa stvarnim ili potencijalnim oštećenjem tkiva. Bol nastaje kao posljedica dvaju složenih procesa: prijenosa bolne informacije s mjesta ozljede do mozga (nocicepcije) te njezine emocionalne i kognitivne obrade u višim centrima u mozgu (Drinovac Vlah, 2017).

Uzroci boli mogu biti različiti: od topline, bakterijskih infekcija, tkivne ishemije ili nagnječenja, mišićnih grčeva... Iako velik broj patoloških stanja može uzrokovati bol, samo ljudsko tijelo potiče reakcije kojima se taj podražaj uklanja (Guyton i Hall, 2017). Stoga osjet boli ima važnu fiziološku ulogu u preživljavanju i zaštiti organizma u okolišu jer omogućuje opažanje štetnog podražaja i njegovo izbjegavanje, čime se oštećenom tkivu daje prilika za cijeljenje (Drinovac Vlah, 2017). Gubitkom ove zaštitne funkcije bol postaje patološka (primjerice uslijed ozljede ili disfunkcije živčanog sustava), kroničnog trajanja te gubi funkciju svrsishodnog upozorenja. Tada sama bol može oštetiti funkcioniranje ili čak i život organizma.

### 1.2.1. Vrste boli i njihove značajke

Bol se može klasificirati na razne načine (Slika 4): prema podrijetlu (kutana – površinska, somatska – iz parijetalnog peritoneuma, visceralna – iz unutarnjih organa...), na temelju trajanja, etiologije ili patofiziologije, intenziteta i simptoma (Bach-Roжеcky 2006).



Slika 4. Klasifikacija boli (prilagođeno prema <https://www.intechopen.com/chapters/76480>)

Na temelju trajanja bol se dijeli na akutnu (brzu, oštru) i kroničnu (sporu, trajnu) bol, pri čemu se one razlikuju po vremenu koje protekne od podražaja do same pojave boli, kao i ovisno o završetku procesa cijeljenja (akutna bol prestaje nakon uklanjanja uzroka, dok kronična traje i nakon toga).

Akutna bol javlja se oko 0,1 sekundu nakon podražaja te se ne osjeća u većini dubokih tkiva. Očituje se kao odgovor na traumu ili upalu i tipična je za poslijeoperacijska stanja. Djeluje kao upozoravajući obrambeni mehanizam čija se adaptivno-zaštitna uloga očituje na način da ozlijeđeno ili upalno područje i okolno tkivo čini preosjetljivim na sve vrste podražaja. Obično se može puno točnije lokalizirati od spore trajne boli uz uvjet da su podraženi i mehanoreceptori. Period trajanja iznosi do tri mjeseca te obuhvaća razdoblje cijeljenja. Ako se ne liječi, može prijeći u kroničnu bol.

Za razliku od akutne, spora se bol javlja tek nakon jedne ili više sekundi nakon čega se pojačava kroz naredni vremenski period koji može iznositi i do nekoliko minuta. Kronična bol traje dulje od tri mjeseca. Rezultat je trajnog patološkog poremećaja, odnosno može se pojaviti u bilo kojem organu ili tkivu te je obično povezana s njihovim razaranjem. Može postojati neovisno o stanju koje je bol iniciralo te traje i nakon procesa cijeljenja. Pacijentima obično uzrokuje dugotrajnu, gotovo nepodnošljivu patnju te se zbog svoje prirode i simptoma smatra posebnom bolešću koja zahtijeva multiterapijske aktivnosti. Specifična značajka kronične boli je preosjetljivost na uobičajene bolne podražaje (hiperalgezija), ali i bol nakon podražaja koji u uobičajenim okolnostima ne može uzrokovati bol (alodinija) (Puljak i Sapunar, 2014; Guyton i Hall, 2017).

Prema etiologiji kao najvažnije oblike moguće je razlikovati nociceptivnu, upalnu i neuropatsku bol. Ove se vrste boli međusobno razlikuju po mehanizmima nastanka, patofiziološkim karakteristikama i trajanju.

**Nociceptivna bol** nastaje prilikom djelovanja podražaja visokog intenziteta na periferne nociceptore u fiziološkim uvjetima. To je akutna bol intenziteta i trajanja proporcionalnog uzroku. Termalni, kemijski ili mehanički bolni podražaj aktivira specifične receptore ili ionske kanale na perifernim živčanim završecima C- i A $\delta$ -vlakana, što dovodi do lokalnog lučenja glutamata koji djeluje preko AMPA, NMDA i kainatnih receptora doprinoseći nocicepciji. Nastali akcijski potencijal prenosi se u leđnu moždinu gdje se aktiviraju sljedeći neuroni u osjetnom putu. Ako je podražaj dovoljno jak, luči se i spori neurotransmitor tvar P koji preko neurokininskih NK1 receptora pojačava postsinaptičku ekscitaciju spinalnih neurona koji u osjetnom putu šalju signale u više supraspinalne centre. Ovaj tip boli djeluje kao rani sustav upozorenja organizma na moguću ozljedu tkiva.

**Upalna bol** javlja se kao posljedica upale ili ozljede tkiva. Nociceptori se aktiviraju podražajem i upalnim medijatorima koje luče stanice oko nociceptora (razni kinini, serotonin, eikozanoidi, citokini). Kao odgovor, iz živčanih završetaka istog nociceptora luče se tvari poput CGRP-a, koji povećava kapilarnu permeabilnost, i tvari P koja uzrokuje vazodilataciju (aksonski refleks). Živčani impuls koji nastaje u jednom ogranku aksonom putuje do leđne moždine, ali i u ostale kolateralne aksonske ogranke. Dio upalnih medijatora neizravno interferira sa signalnim procesima unutar nociceptora zbog čega se smanjuje prag aktivacije samog receptora, a podražljivost membrane aferentnog završetka se povećava, što se naziva perifernom senzitivacijom. Pri upali dolazi i do aktivacije tihih („*silent*“) nociceptora (dio nociceptora u koži koji se ne aktiviraju bolnim podražajima u fiziološkim uvjetima) koji se, djelovanjem medijatora upale, senzitiviraju i odgovaraju na podražaje niskog i visokog intenziteta termalne, mehaničke i kemijske prirode. U SŽS-u uslijed učestalog izbijanja primarnih aferentnih neurona dolazi do središnje senzitivacije i promjena u transkripciji gena za različite molekule uključene u proces nocicepcije. Posljedica ovakvih promjena su primarna i sekundarna hiperalgezija te alodinija.

**Neuropatska bol** nastaje uslijed ozljede ili disfunkcije perifernog živčanog sustava i/ili SŽS-a, primjerice u dijabetesu, kroničnom alkoholizmu, infekciji HIV-om ili kod ozljede leđne moždine. Prema tome može biti periferna ili centralna. Patofiziologija ove vrste boli iznimno je složena, a uključuje brojne patološke promjene na periferiji (mjestu ozljede živca) i na spinalnoj te supraspinalnoj razini (leđna moždina i mozak). Zbog povećane ekscitabilnosti neurona na periferiji nastaje spontana bol (neovisna o podražaju), a u SŽS-u dolazi do središnje senzitivacije. Osim toga karakteriziraju je primarna i sekundarna hiperalgezija, alodinija te parestezije i disestezije (Bach-Rojecky, 2006; Drinovac Vlah, 2017).

Prema intenzitetu bol može biti blaga, umjerena ili jaka. Formalno određivanje jačine boli u ljudi ispituje se kvalitativno pomoću verbalne ljestvice (Koliko je bol jaka?), numeričke ljestvice kod koje bolesnik treba izabrati brojčani izraz za jakost boli od 0 do 10 (0 = nema boli; 10 = najjača bol) te pomoću vizualne analogne ljestvice (eng. *Visual Analogue Scale*, VAS) (<http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/neurologija/bol>).

Postoje i druge, nekategorizirane vrste boli, kao što je odražena bol, odnosno bol koja se osjeća u dijelu tijela koji je vrlo udaljen od tkiva u kojem se javlja uzrok bolnog podražaja ili pak zrcalna bol, bol koja se osjeća na strani tijela suprotnoj onoj na kojoj se dogodila ozljeda (Guyton i Hall, 2017).

## 1.2.2. Receptori za bol i putovi prijenosa bolnih podražaja

Nociceptori, odnosno receptori za bol slobodni su živčani završetci. Gusto su raspoređeni u površinskim slojevima kože, zglobnim površinama, stijenkama arterija te falksu i tentoriju u lubanji, dok se u unutarnjim organima nalaze u manjem broju zbog čega je visceralna bol difuzna i slabo lokalizirana. Reagiraju na podražaje koji mogu uzrokovati oštećenje. Morfološki gledano, to su goli živčani završetci koji nisu obavijeni staničnom kapsulom koja bi ih štitila od djelovanja različitih kemijskih tvari izlučenih ili primijenjenih u kožu. Većina nociceptora iz unutarnjih organa, za razliku od onih u koži, neosjetljivi su na bolne podražaje u fiziološkim uvjetima, odnosno u neozlijeđenom, neupaljenom tkivu, te se aktiviraju upalnim medijatorima (Guyton i Hall, 2017).

Za razliku od drugih vrsta receptora, specifično obilježje nociceptora je slaba prilagodljivost i visoki prag podražaja. Visoki prag podražaja uvjetuje da nociceptore u fiziološkim uvjetima aktiviraju samo podražaji visokog intenziteta. U ekstremnim uvjetima, kao što je oštećenje tkiva ili živca, nociceptori mogu biti aktivirani podražajima nižeg intenziteta i različitim tvarima iz drugih izvora. Slaba prilagodljivost za sobom povlači da dulje vremensko trajanje podražaja u određenim okolnostima može čak povećati pobuđenost receptora. Ovo povećanje osjetljivosti nociceptora na bolni podražaj često je posljedica lučenja lokalnih tkivnih faktora i periferne senzitivacije, a zove se primarna hiperalgezija. Posebice je prisutna kod kronične boli. Osim pretjerane osjetljivosti receptora za bol, uzrok hiperalgezije može biti i facilitacija prijenosa osjeta, što se naziva sekundarnom hiperalgezijom. Ona često nastaje nakon ozljede leđne moždine ili talamusa i javlja se izvan mjesta ozljede.

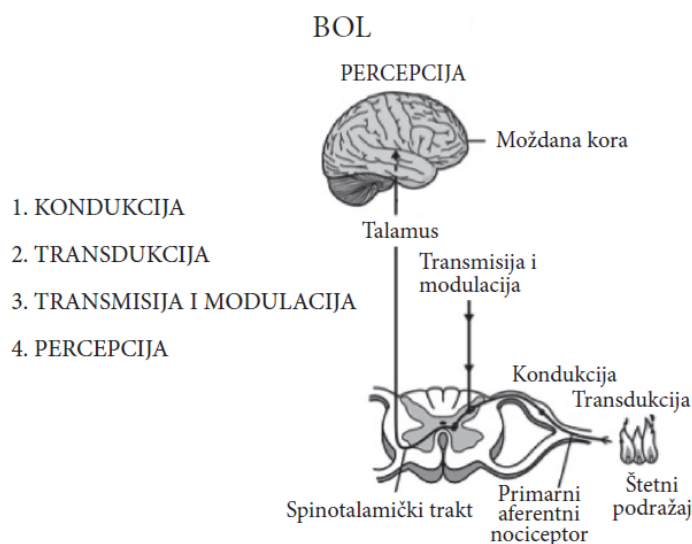
Osim hiperalgezije, bitan pojam koji se veže uz bol je i alodinija, odnosno povećana osjetljivost na podražaje koji nisu bolni, primjerice dodir. Mehanizmi nastanka sekundarne hiperalgezije i alodinije su kompleksni i još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni, ali se smatra kako su procesi na periferiji uslijed ozljede tkiva ili živaca odgovorni za njihov nastanak (Bach-Rojecky, 2006; Guyton i Hall, 2017).

Načelno, postoje tri vrste nociceptora. Prva skupina reagira na intenzivan mehanički podražaj (mehanosenzitivni nociceptori), drugi su osjetljivi na razne kemijske tvari (kemosenzitivni nociceptori) dok treći reagiraju na intenzivnu toplinu i hladnoću (termosenzitivni nociceptori) (Giroto i sur., 2014). Nociceptori također mogu biti unimodalni i polimodalni. Polimodalni registriraju više različitih vrsta podražaja dok unimodalni registriraju samo jednu vrstu (Čulo i

Morović-Vergles, 2016). Nociceptori u koži dijele se u dvije skupine s obzirom na vrstu podražaja na koji reagiraju:

- A $\delta$ -mehaničke - odgovaraju na mehaničke podražaje jakog intenziteta kao što je ubadanje i gnječenje kože; završetci su aferentnih mijeliniziranih A $\delta$  živčanih vlakana osjetnih živaca,
- C-polimodalne - reagiraju na različite vrste štetnih podražaja (mehaničke, toplinske, kemijske); završetci su aferentnih nemijeliniziranih C-vlakana osjetnih živaca.

Generalno gledajući, mehanički i toplinski podražaji uzrokuju brzu bol, dok sve tri vrste podražaja mogu uzrokovati nastanak spore boli (Bach-Rojecky, 2006; Guyton i Hall, 2017). Put širenja bolnog podražaja od mjesta ozljede do mozga poznat je pod imenom bolni put. Uključuje četiri fiziološka procesa: transdukciju, kondukciju, transmisiju i percepciju osjeta boli (Slika 5).



**Slika 5.** Mehanizam nastanka boli (preuzeto iz Čulo i Morović-Vergles, 2016)

Transdukcija je pretvaranje toplinskog, mehaničkog ili kemijskog podražaja nociceptora u akcijski potencijal. Akcijski potencijal prenosi se od nociceptora kroz akson neurona do centralnog završetka aksona koji se nalazi u dorzalnim rogovima leđne moždine u procesu koji se naziva kondukcijom. Potom slijedi transmisija: sinaptičko provođenje bolnog impulsa s jednog neurona na drugi koje uključuje i modulaciju (obradu) signala. Spoznaja boli u somatosenzoričkoj kori velikog mozga označava percepciju, odnosno svjesno doživljavanje osjeta boli.

Osjet boli započinje na periferiji živčanog sustava. Nociceptori se aktiviraju štetnim podražajima koji otvaraju kationske kanale na membrani neurona visokopropusne za ione

kalcija i natrija. Utok pozitivno nabijenih iona izaziva depolarizaciju, a nastali akcijski potencijal prenosi se u SŽS primarnim aferentnim aksonima (periferna grana) do tijela neurona smještenih u dorzalnim rogovima leđne moždine, odnosno u ganglij *nervusa trigemina* ako se radi o kranijalnim živcima. Središnja grana primarnih aferentnih živaca ulazi u leđnu moždinu gdje se aktiviraju naredni (sekundarni) neuroni bolnog puta (Guyton i Hall, 2017).

Postoje dva glavna puta za prijenos bolnih signala u središnji živčani sustav: put za brzu oštru bol i put za sporu trajnu bol (Slika 6). Kroz tanka mijelinizirana vlakna vrste A $\delta$  brzinom od 6 do 30 m/s do leđne moždine provode se signali za brzu i oštru bol koja je dobro lokalizirana. Nemijeliniziranim vlaknima vrste C puno se sporije (brzinom 0,5 - 2 m/s) prenose signali za sporu, trajnu bol. Ovaj tip vlakana tvori većinu perifernih nociceptora i odgovorna su za osjet odgođene i dugotrajnije boli tupog karaktera. Ovakav dvostruki sustav inervacije omogućuje „dvostruki“ osjet boli: bolni podražaj vlaknima A $\delta$  puno se brže prenese do mozga no vlaknima C pa se najprije osjeća oštra, a potom sekundu kasnije i tupa bol.

Kao što je već spomenuto, vlakna za bol ulaze stražnjim spinalnim korjenovima u leđnu moždinu gdje završavaju u dorzalnim rogovima koji su anatomske i elektrofiziološke podijeljeni na lamine. Dalje se bolni impuls širi spinotalamičkim traktom sve do talamusa. Spinotalamički trakt čine sekundarni osjetni neuroni dorzalnih rogova leđne moždine (uglavnom iz lamina I i V), a dijeli se na dva puta: neospinotalamični trakt za prijenos brze i paleospinotalamični (spinoretikulotalamični) trakt za prijenos spore boli. Impuls se može prenositi izravnim monosinaptičkim prijenosom ili preko interneurona koji mogu modulirati osjet boli svojim ekscitacijskim ili inhibicijskim učinkom. Postoji još i spinoretikularni put čiji neuroni polaze iz lamina V, VII, VIII i X, a završavaju u retikularnoj formaciji moždanog debla. Ovaj put odgovoran je za povećano uzbuđenje i stanje budnosti prilikom osjeta boli. U neospinotalamičnom traktu A $\delta$ -vlakna uglavnom prenose mehaničku i akutnu termalnu bol. Ova vlakna većinom završavaju u lamini I te djelomično u dubljim laminama (lamini V) dorzalnih rogova gdje pobuđuju neurone drugoga reda neospinotalamičnog trakta. C-nociceptori pak projiciraju u površinske lamine I i II.

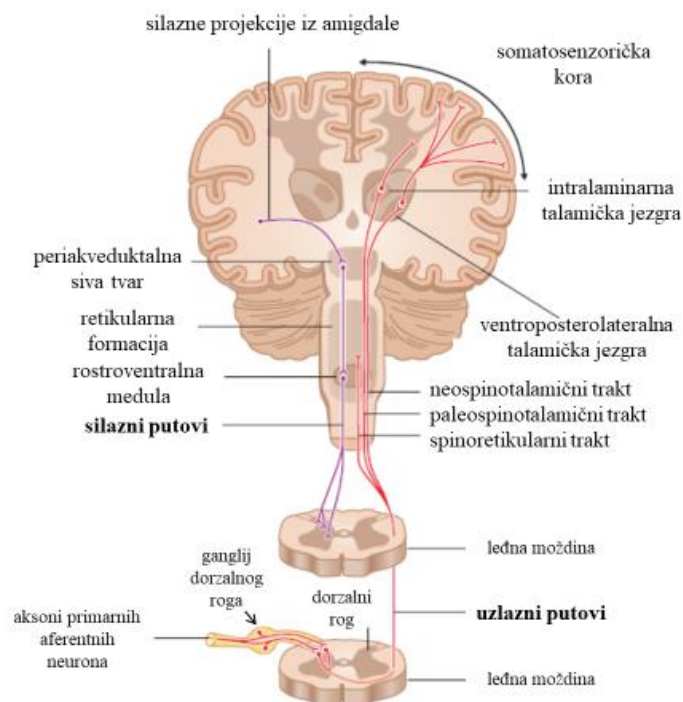
Za prijenos trajne boli odgovoran je paleospinotalamični put. Ovaj sustav može prenositi i dio signala koji putuju A $\delta$  vlaknima. Impulsi se uglavnom provode perifernim vlaknima koja završavaju u laminama II i III dorzalnih rogova leđne moždine. Ove lamine zajednički se nazivaju gelatinoznom tvari.

Od A $\delta$ -neurona odlaze dugačka vlakna koja prednjom komisuram odmah prelaze na suprotnu stranu kralježnične moždine i zatim se anterolateralnim kolumnama penju prema mozgu.



Manji broj vlakana završava u retikularnim područjima moždanoga debla, no većina ih neprekinuta odlazi do talamusa gdje završavaju u ventrobazalnom kompleksu ili djelomično na stražnjoj skupini talamičnih jezgara. Što se paleospinotalamičnog trakta tiče, prije ulaska u laminu V dorzalnog roga, većina signala prolazi unutar samog roga kroz jedan ili više neurona s kratkim vlaknima (interneuroni). Posljednji neuroni u nizu šalju dugačke aksone od kojih se većina združuje s vlaknima brzoga puta. Ovi aksoni najprije prelaze prednjom komisuram na suprotnu stranu leđne moždine, a zatim se anterolateralnim putem penju prema mozgu. Malen dio vlakana neprekinut odlazi u talamus, dok ih većina završava u nekom od područja moždanoga debla. Ta područja su retikularne jezgre produžene moždine, ponsa i mezencefalona, tektalno područje mezencefalona i sivo područje oko akvedukta. Neuroni iz talamusa (gdje završava spinotalamični put) projiciraju potom u somatosenzoričku koru velikog mozga. Prijenos podražaja sekundarnim neuronima do senzomotornog korteksa naziva se transmisija. Međutim, postoje i ogranci za hipotalamus, limbički sustav i druge dijelove mozga pa je percepcija ukupne boli posljedica međudjelovanja brojnih dijelova velikog i malog mozga. Tako je bol usko povezana sa stresom, osjećajima i pamćenjem. Ovakva organizacija bolnog puta objašnjava zašto bolne osjete često prate brojne tjelesne i psihičke reakcije poput promjene krvnog tlaka, pulsa i disanja, znojenja, osjećaja strepnje, tjeskobe, mučnine i povraćanja.

Za razliku od retikularne formacije moždanog debla, talamusa i drugih nižih moždanih centara koji imaju bitnu ulogu u svjesnom osjetu, odnosno zamjećivanju boli, moždana kora je važnija kod interpretacije svojstava boli. Percepcija boli može biti modulirana različitim ekscitacijskim i inhibicijskim mehanizmima (Bach-Rojecky, 2006; Basbaum i sur., 2009; Bullock i Hales, 2013; Paxinos, 2015; Čulo i Morović-Vergles, 2016; Guyton i Hall, 2017).



**Slika 6.** Uzlazni nociceptivni putovi. A $\delta$  i C vlakna završavaju u dorzalnom rogu leđne moždine, otkud se informacija prenosi jednim od tri puta: spinoretikularnim (koji završava u retikularnoj formaciji), neospinotalamičnim ili paleospinotalamičnim putem koji bolni signal prenose u somatosenzoričnu koru na daljnju obradu (preuzeto iz Bullock i Hales, 2013)

### 1.2.3. Neurotransmitori pri nocicepciji

Iz središnjih ili perifernih živčanih završetaka luče se neurotransmitori koji uzrokuju bol ili neurogeni upalu. U njihovu otpuštanju ključnu ulogu igraju naponom regulirani kalcijevi kanali (Basbaum i sur., 2009). Neke od tvari koje posreduju u stvaranju kemijskih bolnih podražaja su bradikinin, serotonin, histamin, kalijevi ioni, kiseline, acetilkolin i proteolitički enzimi. Mogu nastati usred oštećenja tkiva te posljedično uzrokovati sporu bol. Tvar P i prostaglandini ne mogu izravno podražiti receptore za bol, već povećavaju njihovu osjetljivost za druge posrednike.

Neurotransmitor koji sudjeluje u prijenosu brze boli je glutamat, ekscitacijski prijenosnik kojeg luče završetci A $\delta$  živčanih vlakana. Njegovo djelovanje ograničeno je na vrlo kratko vrijeme od samo nekoliko milisekundi. Završetci paleospinotalamičkih vlakana za bol luče pak glutamat i tvar P. Pritom glutamat djeluje trenutačno i kratko, a koncentracija tvari P raste kroz nekoliko sekundi ili minuta zbog sporijeg oslobađanja. Ovaj fenomen također objašnjava pojavu „dvostruke“ boli (Guyton i Hall, 2017).

Iz navedenog se može zaključiti kako je glutamat glavni ekscitacijski neurotransmitor u svim neuronima osjetnog puta. Djeluje preko ionotropnih AMPA i NMDA receptora na perifernim završecima aferentnih živaca te neuronima talamusa i dorzalnog roga leđne moždine. Osim postsinaptički, glutamat u dorzalnom rogu leđne moždine može djelovati i na presinaptičke NMDA receptore na membranama središnjih grana primarnog aferentnog senzornog vlakna. Zbog toga se neurotransmitori pojačano luče u središnje sinapse.

Glutamat se u fiziološkim uvjetima luči na periferiji prilikom aktivacije nociceptora termalnim podražajem ili kapsaicinom te pridonosi nocicepciji preko receptora na primarnim aferentnim završecima nemijeliniziranih C-vlakana. U upali se pojačano izlučuje ne samo iz nociceptora, već i iz okolnih dermalnih ili epidermalnih stanica, makrofaga i Schwannovih stanica čime doprinosi povećanoj podražljivosti neurona. Osim glutamata, tijekom upale se periferno oslobađaju neuropeptidi tvar P i CGRP koji imaju važne autokrine i parakrine učinke (Guyton i Hall, 2017).

Ovisno o podrijetlu živčanog završetka (koža, mišić ili unutarnji organ) te tipu nociceptora (C-vlakna ili A $\beta$ -vlakna) više različitih neurotransmitora može biti kolokalizirano u aferentnim živčanim završecima. Izuzev tvari koje se luče iz središnjih završetaka aferentnog senzornog vlakna (tvar P, CGRP, somatostatin, kortikotropin-otpustajući faktor, kolekistokinin, galanin, vazoaktivni intestinalni peptid...), u dorzalnom rogu leđne moždine iz ne-živčanih izvora luče se brojni drugi medijatori (ATP, NO, prostaglandini, razni neurotropini) koji mogu djelovati sinergistički ili inhibicijski na transmisiju (Bach-Rojecky, 2006).

Ekscitacijski interneuroni u leđnoj moždini djeluju preko ekscitacijskih aminokiselina, tvari P, neurotenzina i VIP-a. Inhibicijski interneuroni mogu izravno djelovati na postsinaptičke neurone u dorzalnom rogu leđne moždine (gdje kalijevi i kloridni kanali osjetljivi na opioide i  $\gamma$ -amino maslačnu kiselinu (engl.  *$\gamma$ -amino butyric acid*, GABA) stvaraju hiperpolarizacijski inhibicijski potencijal) i presinaptički na središnje aferentne završetke (gdje moduliraju otpuštanje glutamata), zbog čega imaju važnu ulogu u regulaciji transmisije. Inhibitorni interneuroni mogu se podijeliti prema neurotransmitorima koji na njih utječu na kolinergične, opioidne i one koji djeluju preko GABA-e. Ekscitacijski i inhibicijski interneuroni postoje i u talamusu gdje također sudjeluju u regulaciji transmisije nociceptivnih signala (Bach-Rojecky, 2006; Morović-Vergles, 2007).

#### 1.2.4. Modulacija nocicepcije

Prijenos bolnih signala reguliran je na jedan od dva načina: analgezijskim sustavom ili kontrolom boli vratima (engl. *gate theory*).

Analgezijski sustav regulira bol potiskivanjem ulaza bolnih signala u živčani sustav. Sastoji se od sive tvari oko akvedukta i periventrikularnih područja mezencefalona i gornjeg dijela ponsa čiji neuroni šalju signale u veliku jezgru rafe (na granici donjega dijela ponsa i gornjega dijela produžene moždine) te retikularnu paragigantocelularnu jezgru (u lateralnom dijelu produžene moždine). Iz ovih se jezgara signali drugoga reda prenose dorzolateralnim kolumnama leđne moždine prema dolje, silaznim (descendentnim) putem do kompleksa za inhibiciju boli u dorzalnim rogovima leđne moždine. Ovdje analgezijski signali mogu zaustaviti bolne signale prije nego što se prekopčaju i krenu prema mozgu. Potiskivanje boli može se postići i podraživanjem periventrikularne jezgre te, u manjoj mjeri, medijalnog snopa telencefalona u hipotalamusu (Guyton i Hall, 2017).

Inhibicijski silazni putovi imaju antinociceptivnu ulogu jer uzrokuju smanjenje lučenja ekscitacijskih neurotransmitora iz središnjih završetaka aferentnih neurona. To se postiže izravno inhibicijom središnjih ogranaka ili indirektno preko inhibicije ekscitacijskih interneurona, odnosno ekscitacije inhibicijskih interneurona u dorzalnom rogu leđne moždine. Primjerice, silazni noradrenergični i serotonergični putovi potiskuju osjet boli aktivacijom inhibitornih interneurona u leđnoj moždini. Živčana vlakna iz periventrikularnih jezgara i sive tvari oko akvedukta šalju signale u dorzalne rogove leđne moždine tako što na svojim završetcima luče serotonin koji potiče lokalne moždinske neurone na lučenje enkefalina. Uz  $\beta$ -endorfine, koje luče leukociti u upalnim reakcijama, enkefalini su dio sustava endogenih opioidnih analgetika. Oni uzrokuju presinaptičku i postsinaptičku inhibiciju ulaznih C- i A $\delta$ -vlakana na mjestima gdje ta vlakna u dorzalnim rogovima tvore sinapse. Dakle, analgezijski sustav zaustavlja bolne signale na mjestu njihova ulaska u leđnu moždinu (Bach-Rojecky, 2006; Čulo i Morović-Vergles, 2016; Guyton i Hall, 2017).

Drugi način na koji osjet boli može biti potisnut jest neškodljivim podražajima kao što su osjet dodira, blaga toplina i vibracija (Čulo i Morović-Vergles, 2016). Naime, istovremeni podražaj ne-nociceptivnih mehanoreceptora (A $\alpha$ - i A $\beta$ -vlakna) uzrokuje aktivaciju inhibicijskih interneurona u dorzalnom rogu leđne moždine koji smanjuju transmisiju bolnih informacija otpuštanjem endorfina ili GABA-e (teorija o kontroli boli vratima) (Bach-Rojecky, 2006).

## 1.2.5. Senzitivizacija i mehanizmi njezina nastanka

Senzitivizacija je pojava pojačanja osjeta boli uslijed ponovljenog i učestalog podraživanja nociceptora te je fenomen karakterističan isključivo za bol. Dok kod drugih osjetnih stanica dugotrajniji podražaji uzrokuju njihovu prilagodbu i smanjenu podražljivost, dugotrajnim podraživanjem nociceptora bol se pojačava i iz akutne prelazi u kroničnu. Pojačanje osjeta boli može nastati smanjenjem inhibicijskih mehanizama ili promjenom gustoće i aktivnosti receptora i praga osjetljivosti nociceptora procesima translacije i transkripcije. Senzitivizacija može biti periferna ili središnja. Obje vrste karakteristične su za upalnu i neuropatsku bol (Bach-Rojecky, 2006; Čulo i Morović-Vergles, 2016).

**Periferna senzitivizacija** stanje je povećane podražljivosti nociceptora. Medijatori upale (NO, serotonin, bradikinin, prostaglandini) oslobađaju se na periferiji i vežu za metabotropne receptore spregnute s G-proteinima na membranama perifernih aferentnih završetaka. To dovodi do aktivacije unutarstaničnih protein kinaza A i C koje fosforiliraju ionske kanale (npr. ASIC kanali) i receptore (npr. TRPV1) zbog čega se smanjuju pragovi njihove aktivacije. Posljedično spontano nastaju akcijski potencijali (neovisno o podražaju).

**Središnja senzitivizacija** javlja se ako je povećana podražljivost sekundarnih osjetnih neurona u dorzalnog rogu leđne moždine. Nastaje kao posljedica periferne senzitivizacije i učestalog ulaza informacija s periferije. Može se podijeliti na brzu i odgođenu (Bach-Rojecky, 2006).

**Brza senzitivizacija** nastaje uslijed lučenja glutamata i neuropeptida iz središnjih aksona primarnog neurona. Zbog akutne stimulacije nociceptora pojačava se središnje lučenje glutamata koji aktivira AMPA receptore, dok se zbog pojačanog ulaza informacija s periferije aktiviraju NMDA receptori. Ovo rezultira postsinaptički povećanom koncentracijom  $Ca^{2+}$  što je odgovorno za aktivaciju neuronalne NO sintaze. Sintetizirani NO difundira u presinaptičku stanicu gdje aktivira kaskadu NO-ciklički gvanozin monofosfat što rezultira povećanim lučenjem ekscitacijskih aminokiselina i tvari P u središnje sinapse. Tvar P može djelovati i preko autoreceptora na presinaptičkim središnjim završetcima aferentnih vlakana pojačavajući lučenje glutamata.

Tvar P,  $Ca^{2+}$  i drugi kinini, koji djeluju preko metabotropnih receptora na središnjim neuronima, aktiviraju protein kinaze A i C koje fosforiliraju receptore i ionske kanale čime povećavaju njihovu podražljivost. Uz to dolazi do povećanja broja NMDA receptora. Glijne stanice dorzalnog roga mogu se aktivirati glutatom, tvari P, NO i prostaglandinima nakon

čega luče proupalne citokine (npr. faktor tumorskog rasta) i interleukine te ATP i NO koji igraju bitnu ulogu u procesu središnje senzitivacije.

**Odgodena senzitivacija** posljedica je transkripcijskih promjena u neuronima dorzalnih rogova. One obuhvaćaju povećanu ekspresiju *c-fos* gena i gena za ciklooksigenazu tipa 2 (COX-2) uslijed oslobađanja i aktivacije različitih transkripcijskih faktora (npr. citokina iz glija stanica) što dovodi do povećane sinteze prostaglandina koji postsinaptički i presinaptički djeluju ekscitatorno ili reduciraju inhibitory transmisiju. Ekspresija gena za prodinorfin, neurokinin i brojne druge receptore također može biti povećana (Bach-Rojecky, 2006).

Sve navedene središnje i periferne promjene doprinose povećanoj podražljivosti neurona u osjetnom putu, ali i pojačanju odgovora na sam bolni podražaj.

### **1.3. Životinjski eksperimentalni modeli boli**

Životinjski modeli nocicepcije, odnosno boli, prisutni su u znanstvenim istraživanjima od kraja 19. stoljeća te od tada igraju ključnu ulogu u razumijevanju bolnih procesa. Ovi modeli sadrže dvije bitne komponente prema kojima se razlikuju: metodu uzrokovanja boli i posljedično mjerenje intenziteta boli. Bolni procesi u modelu moraju što je vjerodostojnije moguće oponašati mehanizme specifičnog kliničkog stanja koje se ispituje. Bol može biti uzrokovana primjenom različitih supstanci s upalnim i nadražujućim djelovanjem, izravnom ozljedom tkiva, a može se razvijati spontano kao posljedica određenog stanja (npr. dijabetesa) ili kao posljedica manipulacije genima (transgenični modeli). Najčešći parametri koji se procjenjuju i kvantificiraju uključuju preosjetljivost na termalni, mehanički ili kemijski podražaj, zatim promjene ponašanja i facijalne ekspresije životinja. Vrste testova i primjeri njihovog uzrokovanja prikazani su u Tablici 2 (Gregory i sur., 2013).

**Tablica 2.** Vrste modela životinjske boli i testovi kojima se ispituje intenzitet boli (prilagođeno prema Gregory i sur., 2013)

TESTOVI REFLEKSIVNE BOLI		NEREFLEKSIVNI TESTOVI	MODELI BOLI	
VRSTA TESTA	RAZVIJENA METODA	VRSTA TESTA	VRSTA MODELA	RAZVIJENA METODA
termalni	test pomaka repom, test vruće ploče, Hargreaves test	spontano bolno ponašanje (kvantifikacija podizanja i lizanja šape nakon injiciranja formalina)	upalna bol	formalinski test, karagenanski test, kapsaicinski test, test kompletnim Freundovim adjuvansom (eng. <i>Complete Freund's adjuvant</i> , CFA)
		izbjegavanje bolnog podražaja	neuropatska bol	parcijalno presijecanje n. ischiadicusa, konstriksijska ozljeda n. ischiadicusa, podvezivanje spinalnog živca, presijecanje ventralnih korjenova, dijabetička polineuropatija uzrokovana streptozotocinom, polineuropatija uzrokovana paklitakselom
mehanički	testiranje Von Freyevim filamentima	kvaliteta života i funkcionalnost životinje	maligna bol	ksenograft kanceroznih stanica
			artritična bol	injekcije karagenana s ili bez kaolina, kapsaicina, CFA u zglob, sistemska primjena CFA, uništavanje tkiva oko zgloba
			mišićna bol	injiciranje iritansa u mišić (karagenana, CFA, hipertoničnih otopina...)
			postoperativna bol	longitudinalni rez kroz kožu, fasciju ili mišić
			visceralna bol	električna struja, ishemija, mehanička trauma

### 1.3.1. Karagenanski test

Karagenan se u ovom testu injicira u stražnje šape, mišić ili zglob ispitivanih životinja što rezultira akutnom upalom i boli. Karagenan djeluje na stanice tkiva, dovodi do akumulacije neutrofila i oslobađanja različitih medijatora upale koji uzrokuju jaku dvofaznu upalnu reakciju karakteriziranu edemom (šape se povećaju i do 150%) i hiperalgezijom. Uzrok tome je oštećenje tkiva i lučenje različitih medijatora iz okolnih stanica koji aktiviraju ili senzitiviraju periferne nociceptore. Javlja se osjetljivost na termalne i mehaničke podražaje na mjestu primjene (primarna hiperalgezija), kao i udaljeno od njega (sekundarna hiperalgezija). Intenzitet upale te termalne i mehaničke hiperalgezije najjači je 2-6 sati nakon injiciranja te se nakon toga smanjuje unutar 24-72 sata. Dodatno se kod životinje uočava pojačano čuvanje i smanjenje težinskog opterećenja stražnjih udova, spontano bolno ponašanje i smanjena aktivnost na kotaču za trčanje. Ovakav model koristan je u istraživanjima akutne upalne boli te vjerno oponaša uvjete povezane s ozljedom tkiva kao što su uganuća, istegnuća i miozitis (Bach-Rojecky, 2006; Gregory i sur., 2013).

## 1.4. c-Fos

### 1.4.1. Struktura i mehanizam djelovanja

Protoonkogen *c-fos* nakon aktivacije staničnih receptora neurotransmitorima može brzo biti stimuliran na transkripciju te se stoga naziva genom ranog odgovora (engl. *immediate early gene*, IEG). IEG djeluju poput transkripcijskih faktora budući da kontroliraju aktivnost drugih gena (nazvanih genima kasnog odgovora, engl. *late onset genes*) kroz vezanje svog proteinskog produkta za specifične sekvence u 5' netranslatiranoj regiji gena kasnog odgovora (Hunter i sur., 1995).

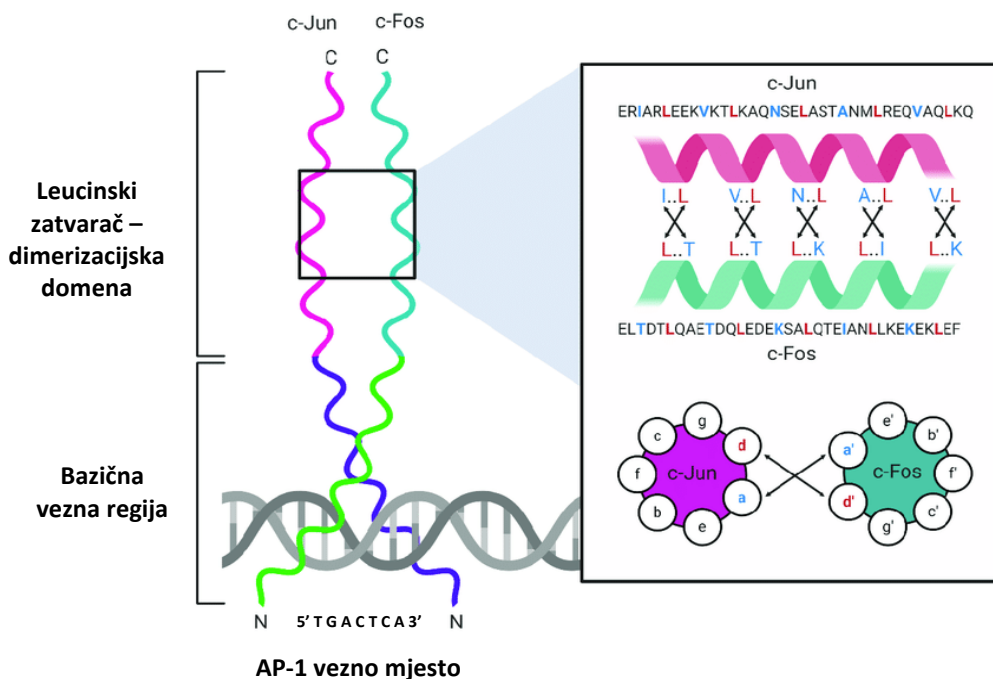
U porodicu Fos proteina spadaju c-Fos, FosB, Fra-1 i Fra-2, a kodirani su genima koji sadrže četiri eksona i tri introna (Kovacz, 1998).

c-Fos, protein protoonkogenog *c-fos*, sintetizira se kao 55 kilodaltonski produkt koji nakon posttranslacijske fosforilacije katalizirane Fos regulatornom kinazom daje produkt od 62 kDa. Karakteristično za ovaj protein je posjedovanje motiva leucinskog zatvarača koji promovira stvaranje dimera, najčešće s proteinima porodice Jun (c-Jun, Jun B, Jun D). Ovi heterodimeri zapravo su transkripcijski faktori naziva AP-1 (engl. *activator protein 1*) čija je zadaća transaktivacija gena kasnog odgovora vezanjem za AP-1 promotorsku regiju što podvrgava stanicu dugotrajnim promjenama u njezinom fenotipu (Hoffman i sur., 1993; Kovacz, 1998).

Proteini Jun porodice, kao i c-Fos, stvaraju  $\alpha$ -zavojnice. Karboksi krajevi zavojnica formiraju upredenu zavojnicu, a amino krajevi stupaju u kontakt s bazama DNA u velikom utoru. Zahvaljujući posttranslacijskoj fosforilaciji koja poboljšava njihovu sposobnost vezanja za DNA, podjedinice upredene zavojnice fleksibilno se vežu za svoju metu: slijed 5'TGACTCA3' u regulatornim regijama ciljanih gena (Slika 7). Ovisno o sastavu heterodimera, AP-1 kompleks stimulira ili suprimira transkripciju. Tako c-Fos u kompleksu s c-Jun ima uglavnom stimulatorni, a u kompleksu s Jun-B inhibitorni učinak (Glover i Harrison, 1995; Kovacz, 1998).

Iako je stvaranje homodimera moguće, zbog povećane stabilnosti preferirano je nastajanje heterodimera. Između podjedinica dimera postoje brojne elektrostatske interakcije. Homodimeri u odnosu na heterodimere sadrže veći broj nepovoljnih odbijanja istoimenih naboja između lanaca što rezultira destabilizacijom (Glover i Harrison, 1995).





**Slika 7.** Prikaz strukture AP-1 kompleksa te interakcija između podjedinica (c-Fos i c-Jun) međusobno i s ciljanim slijedom DNA. Leucinski zatvarač koji promovira stvaranje heterodimera organiziran je kao ponavljajući slijed od sedam aminokiselina označene kao a-g na slici dolje desno. Hidrofobne interakcije (označene crnim strelicama na slici) između aminokiselina na pozicijama a (a') i d (d') stabiliziraju dimer (prilagođeno prema [https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-the-c-Jun-c-Fos-heterodimer-The-c-Jun-c-Fos-complexes-bind-DNA-as\\_fig1\\_342932428](https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-the-c-Jun-c-Fos-heterodimer-The-c-Jun-c-Fos-complexes-bind-DNA-as_fig1_342932428))

## 1.4.2. c-Fos kao neuralni marker boli

Hunt i suradnici su 1987. prvi izvijestili o indukciji ekspresije c-Fosa u površinskim i dubokim laminama dorzalnih rogova leđne moždine nakon periferne bolne stimulacije stražnje šape štakora. Od tada je u brojnim studijama dokazana prisutnost c-Fos pozitivnih neurona u leđnoj moždini nakon akutnog bolnog podražaja na periferiji, ozljede perifernih živaca i subkutane upale. S obzirom da je broj c-Fos pozitivnih neurona proporcionalan intenzitetu bolnog podražaja, c-Fos se danas često koristi kao marker aktivacije nociceptivnih neurona u leđnoj moždini, kao i na supraspinalnoj razini (Harris, 1998; Jergova i sur., 2002). c-Fos je uključen u signalnu kaskadu koja povezuje izvanstanične događaje s dugotrajnom unutarstaničnom prilagodbom na njih. Jedan od načina na koji vjerojatno doprinosi dugotrajnoj modulaciji spinalnih nociceptivnih procesa je posredovanje promjena u nociceptivnim putevima koji vode do hiperalgezije i alodinije. Ovu tezu podupire povećana ekspresija c-Fosa u kralježničkim neuronima koji uzrokuju hiperalgeziju i alodiniju, kao i smanjenje ekspresije pod utjecajem antagonista NMDA receptora i inhibitora NO sintaze.

Procesi koji vode do hiperalgezije i alodinije induciraju ekspresiju opioidnih peptida - fizioloških analgetika. Dokazana je kolokalizacija ekspresije c-Fosa i dinorfina, kao i povećanje boli u formalinskom testu nakon što je štakorima intratekalno primijenjen *antisense* oligonukleotid kojim je blokirana sinteza c-Fosa, ali i smanjena ekspresija prekursora dinorfina - preprodinorfina. Dakle, c-Fos je uključen u smanjenje intenziteta i vremenskog trajanja boli indukcijom sinteze opioidnih peptida u leđnoj moždini (Harris, 1998).

Dok je većina studija c-Fosa i nocicepcije fokusirana na leđnu moždinu, postoji i značajan broj studija koje koriste ekspresiju c-Fosa za istraživanje nocicepcije u mozgu. Primjerice, promatrana je ekspresija c-Fosa u moždanom deblu, hipotalamusu i talamusu te periakveduktalnoj sivoj tvari štakora nakon mehaničke i termalne stimulacije. Pozitivni rezultati ovakvih studija pokazali su da se ekspresija Fos proteina može koristiti za identifikaciju nociceptivne obrade na mjestima ograničene dostupnosti, što se ne može provesti elektrofiziološkim mjerenjima. Stoga se c-Fos može koristiti za fina razgraničenja područja koja jesu ili pak nisu aktivirana bolnom stimulacijom, kao i za otkrivanje ukupne distribucije neurona koji odgovaraju na bolni podražaj.

Brojni fiziološki događaji, uključujući toplinske, mehaničke i kemijske podražaje, uspijevaju potaknuti ekspresiju c-Fosa u neuronima SŽS. Većina istraživanja koja su to potkrijepila provedena su na štakorima, ali postoje i studije koje su pokazale da se isti procesi odvijaju i u miševa, mačaka i zamorčadi. Svaka od ovih studija potvrdila je vezu nocicepcije i ekspresije c-Fosa u kralježničkim neuronima, dajući rezultate koji se slažu s dosadašnjim saznanjima o nociceptivnim putevima. Također, dokazano je i postojanje korelacije između ekspresije c-Fosa i intenziteta bolnog podražaja: čim je jači podražaj, veća je ekspresija c-Fosa (Gao i Ji, 2009). Pritom su c-Fos pozitivni neuroni smješteni u laminama I, II, V i VI na razini dorzalnog roga leđne moždine što odgovara smještaju završetaka primarnih nociceptivnih neurona (Harris, 1998).

S obzirom da je *c-fos* gen ranog odgovora, njegova ekspresija kao odgovor na podražaj veoma je brza. Transkripcijska aktivacija gena započinje unutar nekoliko minuta od bolne stimulacije, a akumulacija mRNA doseže svoj maksimum 30 do 40 minuta kasnije. Nasuprot tome, ekspresija c-Fos proteina doseže svoj vrhunac dva sata nakon indukcije transkripcije gena. Ekspresija gena obično se mjeri Northern blot analizom ili *in situ* hibridizacijom, dok su proteini obično vizualizirani imunohistokemijskom metodom.

Prednosti koje c-Fos kao marker neuralne aktivacije nudi u ispitivanju boli su brojne, kao što je brzina i robusnost ekspresije c-Fosa nakon bolnog podražaja. U usporedbi s ostalim tehnikama lakše je identificirati preciznu lokaciju neurona koji odgovaraju na bolni podražaj,

ekspresija se može kvantitativno analizirati relativno jednostavnim postupcima imunohistokemije te se zbog smještaja c-Fosa u jezgri ova metoda može provoditi zajedno s drugim tehnikama koje omogućavaju karakterizaciju neurona koji ekspimiraju c-Fos nakon bolnog podražaja. Ovaj tip analize broja c-Fos ekspimirajućih neurona omogućuje pouzdano uspoređivanje učinaka različitih manipulacija nociceptivnim sustavom na samu nocicepciju. Potom, za razliku od elektrofizioloških analitičkih tehnika, ova metoda ne zahtijeva anesteziranje i obuzdavanje životinja tijekom bolne stimulacije zbog čega životinje mogu biti budne (odnosno postižu se normalni uvjeti u pokusu).

Unatoč svim prednostima, potrebno je prepoznati i nedostatke ove metode. Direktna uloga c-Fosa u regulaciji boli još uvijek nije u potpunosti razjašnjena, a bolna stimulacija mora biti jaka i trajati određeno vrijeme prije no što se dosegne mjerljiva ekspresija c-Fosa. Potreban je oprez prilikom usporedbe aktivnosti različitih klasa neurona putem c-Fosa jer je podražajni prag za indukciju ekspresije različit među pojedinim vrstama neurona. Nadalje, idealni parametri za uočavanje promjena u ekspresiji c-Fosa nisu ujedno idealni za mjerenje boli bihevioralnim pokusima. Postoji rizik od lažno pozitivnih, ali i lažno negativnih rezultata. Za lažno negativne rezultate odgovorni mogu biti odgoda ekspresije c-Fosa u odnosu na bolni podražaj te činjenica da se c-Fos ne ekspimirira u svim neuronima koji su aktivirani bolnim podražajem (odnosno, odsustvo c-Fosa ne znači nužno nedostatak neuralne aktivnosti). Nasuprot tome, lažno pozitivni rezultati mogu biti posljedica izazivanja aktivnosti stanica podražajima koji nisu bolni. Nadalje, zbog odgode ekspresije c-Fosa otežano je utvrditi koji su točno događaji direktno odgovorni za pokretanje ekspresije gena. Primjerice, ekspresija *c-Fosa* može biti posljedica bolne stimulacije, ali i stresnog odgovora ili motoričke aktivnosti povezanih s boli. Također, ekspresija *c-Fosa* ovisi i o stanju budnosti životinje. Ekspresija je veća kod budnih štakora, a većina istraživanja provodi se danju, dok su štakori uspavani. Ovi problemi mogu se izbjeći pažljivim dizajnom eksperimenta, te uzimajući u obzir prednosti i nedostatke same metode i c-Fosa kao nespecifičnog markera neuronalne ekspresije povezane s boli (Harris, 1998; Gao i Ji, 2009).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Iako danas postoje brojne opcije za liječenje boli, kao što su nesteroidni protuupalni lijekovi (engl. *non-steroidal antiinflammatory drugs*, NSAID), opioidni agonisti ili pak adjuvantni analgetici, neodgovarajuća terapija boli, posebno one kroničnog trajanja, još je uvijek jedan od bitnijih medicinskih problema. Trenutno odobreni analgetici varijabilne su učinkovitosti i kratkotrajnog djelovanja, uzrokuju brojne nuspojave te stupaju u interakcije s ostalim lijekovima koje pacijenti imaju u terapiji, a moguć je i razvoj tolerancije i ovisnosti na opioidne agoniste. Osim navedenog, veliki problem je i to što su neka kronična bolna stanja otporna na klasičnu terapiju. Stoga ne čudi konstantno ulaganje u razvoj novih analgetika.

BT-A je do sada u raznim istraživanjima pokazao dugotrajno (višemjesečno) antinociceptivno djelovanje uz minimalne nuspojave nakon jednokratne lokalne primjene niskih doza, što ga razlikuje od klasičnih sistemskih analgetika koji se u terapiji kronične boli moraju uzimati svakodnevno tijekom dužeg razdoblja. Dodatno, nije primijećen razvoj tolerancije niti potencijal za zlouporabu.

Iako je učinak BT-A dosad ispitivan u različitim bolnim stanjima, trenutno je odobren samo za prevenciju kronične migrene. Kako bi se proširile trenutne indikacije, provodi se velik broj pretkliničkih i kliničkih istraživanja kojima je cilj detaljno razjasniti antinociceptivno djelovanje BT-A te utvrditi učinkovite doze, mjesta primjene i interval doziranja, kao i prepoznati pacijente koji bi imali najveću korist od njegove primjene (Drinovac Vlah, 2017).

Usprkos uvriježenoj hipotezi o inhibiciji lučenja neurotransmitora na perifernim završecima senzornih neurona, što bi indirektno smanjilo središnju senzitivaciju, brojna novija istraživanja pokazuju da je antinociceptivno djelovanje BT-A na upalnu i neuropatsku bol središnjeg porijekla, s dorzalnim rogom leđne moždine kao vjerojatnim primarnim mjestom djelovanja. Dakle, antinociceptivno djelovanje BT-A ne uključuje samo periferne, već i „gornje” dijelove nociceptivnog neurona, kamo toksin dolazi retrogradnim transportom nakon periferne primjene. Iako je potvrđeno kako je antinociceptivno djelovanje BT-A posredovano preko SŽS, precizno mjesto djelovanja i mehanizam BT-A u SŽS još uvijek nisu istraženi do kraja (Bach-Rojecky, 2006; Drinovac Vlah, 2017).

Također se istražuje primjena BT-A u zrcalnoj boli, fenomenu u kojem se bol percipira i u neozlijeđenom području koje se nalazi kontralateralno u odnosu na mjesto ozljede. BT-A je zasad jedina poznata tvar s bilateralnim učinkom u različitim tipovima eksperimentalne boli

nakon unilateralne periferne aplikacije, iako sami mehanizmi njegova djelovanja (kao ni nastanka zrcalne boli) nisu do kraja razjašnjeni (Drinovac Vlah i Bach-Rojecky, 2020).

Cilj ovog diplomskog rada je istražiti antinociceptivni učinak BT-A nakon njegove periferne primjene intraplantarno u stražnje šape štakora na modelu upalne boli uzrokovane karagenanom. Kako bi se preciznije ispitalo djelovanje na spinalnoj razini, posebice djelovanje na kontralateralnoj strani od mjesta primjene, kao i mogućnost transsinaptičkog transporta, promatran je utjecaj BT-A na ekspresiju c-Fosa kao markera aktivacije neurona uslijed prethodne bilateralne bolne stimulacije.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Životinje i njihovo tkivo za analizu

Za potrebe izrade ovog diplomskog rada analizirani su uzorci poprečnih prereza lumbalnih (L4/L5) segmenata leđne moždine pokusnih životinja, odnosno mužjaka štakora soja Wistar starosti 5 mjeseci, težine između 400 i 500 grama. Štakori korišteni u ovom istraživanju uzgojeni su na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u optimalnim uvjetima svjetla i tame uz neograničen pristup hrani i vodi. Nakon provedenih bihevioralnih mjerenja životinje su anestetizirane te je tkivo od interesa (mozak i leđna moždina) izvađeno i smrznuto na  $-80^{\circ}\text{C}$ . Sav rad sa životinjama, počevši s injiciranjem te završno sa žrtvovanjem i uzimanjem tkiva, proveden je od strane osoba osposobljenih za rad s eksperimentalnim životinjama sukladno Zakonu o zaštiti životinja (NN 102/17). Osim navedenog zakona, tijekom izvođenja pokusa poštivale su se smjernice Međunarodne udruge za proučavanje boli (engl. *International Association for Study of Pain*, IASP). Za izvođenje pokusa dobivena je dozvola od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

### 3.2. Ispitivana tvar, botulinum toksin tipa A (BT-A)

U pokusu je korišten botulinum toksin tipa A (Botox®, Allergan, SAD). U svakoj pojedinoj bočici sadržano je 100 i.j. ( $\sim 4,8$  ng) pročišćenog *Clostridium botulinum* toksina tipa A u obliku liofilizata. Jedna i.j. odgovara količini toksina koja nakon intraperitonealne primjene uzrokuje smrt kod 50% miševa ( $\text{LD}_{50} = 0.048$  ng = 1 i.j.). Sadržaj bočice otopljen je u fiziološkoj otopini kako bi se dobila potrebna koncentracija od 7 i.j./kg. Sedam dana prije izvođenja karagenanskog testa, dvjema skupinama pokusnih životinja periferno je primijenjena ukupna doza od 7 i.j./kg u volumenu od 20  $\mu\text{l}$  na način da je ukupan volumen injiciran intraplantarno (i.pl.) nakon namještanja stražnje desne šape u ispravan položaj. Ispravnost injiciranja provjerena je opipavanjem injiciranog mjesta (mjehurić na mjestu injiciranja).

### 3.3. Antitoksin za botulinum toksin tipa A (anti-BT-A)

U pokusu je korišten antitoksin za botulinum toksin tipa A (eng. *Non-affinity purified equine IgG*, National Institute for Biological Standards and Control, VB, dar: Thea Sesardic) koncentracije 100 i.j./100  $\mu\text{L}$ . Kako bi se dobila potrebna doza od 2 i.j./10  $\mu\text{L}$  anti-BT-A je pripremljen u fiziološkoj otopini. U ovom je eksperimentu jedan dan nakon aplikacije BT-A,

odnosno šest dana prije izvođenja karagenanskog testa jednoj skupini pokusnih životinja intratekalno (i.t.) u leđnu moždinu na razini L5 injiciran anti-BT-A u dozi od 2 i.j./10 µL.

### **3.4. Eksperimentalni model boli: karagenanski test (2%)**

Kako bi se budnim štakorima uzrokovala bol, u plantarnu stranu obiju stražnjih šapa injicirano je po 100 µL 2 %-tne otopine karagenana u fiziološkoj otopini ( $\lambda$ -Carrageenan, Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD). Kontrolnoj skupini životinja injiciran je jednaki volumen fiziološke otopine. Karagenan kod životinja koje se slobodno kreću uzrokuje jaku akutnu upalnu reakciju praćenu edemom. Osim toga, uzrokuje termalnu i mehaničku hiperalgeziju, čiji je intenzitet najjači 2 - 6 sati nakon injiciranja te se nakon toga smanjuje u narednih 24 do 72 sata (Bach-Rojecky, 2006). Bol je praćena bihevioralnim pokusima koje su provele osobe osposobljene za rad s laboratorijskim životinjama.

### **3.5. Eksperimentalni protokol**

#### **3.5.1. Priprema uzoraka za imunohistokemijsku analizu**

U eksperimentu su životinje podijeljene u četiri skupine koje su sadržavale po osam životinja (Tablica 3):

- 1) kontrolna skupina – sedam dana prije karagenanskog testa injicirana je fiziološka otopina i.pl. u desnu šapu štakora, odnosno šest dana prije karagenanskog testa injiciran je konjski serum\* i.t.; potom je sedmi dan fiziološka otopina i.pl. injicirana u obje šape
- 2) eksperimentalna kontrolna skupina – sedam dana prije karagenanskog testa injicirana je fiziološka otopina i.pl. u desnu šapu štakora, odnosno šest dana prije karagenanskog testa injiciran je konjski serum\* i.t.; potom je sedmi dan injiciran karagenan (2%) i.pl. u obje šape
- 3) eksperimentalna skupina I - sedam dana prije karagenanskog testa injiciran je BT-A i.pl. u desnu šapu štakora, odnosno šest dana prije karagenanskog testa injiciran je konjski serum\* i.t.; potom je sedmi dan injiciran karagenan (2%) i.pl. u obje šape
- 4) eksperimentalna skupina II - sedam dana prije karagenanskog testa injiciran je BT-A i.pl. u desnu šapu štakora, odnosno šest dana prije karagenanskog testa injiciran je anti-BT-A i.t.; potom je sedmi dan injiciran karagenan (2%) i.pl. u obje šape

*\*Konjski serum u skupini 1, 2 i 3 je kontrola antitoksinu (anti-BT-A) te je primijenjen u jednakom volumenu na jednaki način i nema nikakvu fiziološku aktivnost.*

**Tablica 3.** Prikaz eksperimentalnog tretmana pojedinih skupina životinja

skupina	tretman		
	0.dan/i.pl. unilateralno (desna šapa)	1. dan/i.t.	6.dan/i.pl. bilateralno
<b>DAN/PRIMJENA</b>			
<b>kontrolna skupina</b>	F.O.	K.S. 2 i.j./10 µL	F.O.
<b>eksperimentalna kontrolna skupina</b>	F.O.	K.S. 2 i.j./10 µL	KAR., 2%
<b>eksperimentalna skupina I</b>	BT-A 7 i.j./kg	K.S. 2 i.j./10 µL	KAR., 2%
<b>eksperimentalna skupina II</b>	BT-A 7 i.j./kg	AT 2 i.j./10 µL	KAR., 2%

*Legenda:* F.O. = fiziološka otopina, K.S. = konjski serum, KAR. = karagenan, BT-A = botulinum toksin tip A, AT = antitoksin na BT-A, i.j. = internacionalna jedinica

Tri sata po i.pl. primjeni otopine karagenana ili fiziološke otopine štakori su duboko anestetizirani kombinacijom anestetika ketamina (70 mg/kg) i ksilazina (35 mg/kg) te podvrgnuti transkardijalnoj perfuziji s paraformaldehidom radi uzimanja tkiva mozga i leđne moždine. Uzorci su preko noći čuvani u 10 %-tnoj otopini sukroze u paraformaldehidu na temperaturi od 4 °C te idući dan u 30 %-tnoj otopini sukroze u fosfatnom puferu (engl. *phosphate buffered saline*, PBS). Potom su smrznuti na temperaturama do -80 °C do daljnje uporabe. Koristeći kriostat (CM1850, Leica Biosystems, Nussloch, Njemačka) iz prethodno smrznutih moždina poprečno su izrezani uzorci lumbalnih segmenata (L4/L5) čija je debljina prereza iznosila 35 µm. Takvi su uzorci potom podvrgnuti imunohistokemijskoj analizi.

### 3.5.2. Korištene kemikalije, reagensi i protutijela

Za imunohistokemijsku analizu korišteno je sljedeće:

- a) kemikalije
  - 1) Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)
  - 2) Kozji serum (engl. *normal goat serum*, NGS) (Millipore, Burlington, Massachusetts, SAD)
  - 3) Natrijev klorid (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
  - 4) Kalijev klorid (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
  - 5) Kalijev hidrogenfosfat, bezvodni (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
  - 6) Natrijev fosfat, dibazični anhidrični (CARLO ERBA Reagents, Val-de-Reuil, Francuska)
  - 7) medij za očuvanje fluorescencije *Fluoroshield with DAPI* (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)



b) protutijela

- 1) primarno zečje poliklonsko protutijelo na c-Fos (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Kalifornija, SAD); razrjeđenje 1:400
- 2) sekundarno kozje IgG protutijelo Alexa Fluor-488 (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, SAD); razrjeđenje 1:400

c) ostalo

- 1) centrifuga Mikro 120 (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Njemačka)
- 2) fluorescentni mikroskop (Olympus BX51, Olympus, Tokyo, Japan) spojen na digitalnu kameru (Olympus DP-70, Olympus, Tokyo, Japan).

Za imunohistokemiju potrebno je pripremiti PBS, PBS-T, normalni kozji serum (engl. *normal goat serum*, NGS), primarno i sekundarno protutijelo.

PBS 1x priprema se razrjeđivanjem PBS 10x deioniziranom vodom. PBS 10x sastoji se od 18g NaCl, 0,4g KCl, 2,26g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> i 0,4g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> otopljenih u 200 ml deionizirane vode.

PBS-T, odnosno PBS-Triton X, priprema se u koncentraciji od 0,25% na način da se u 40 ml PBS-a 1x pipetom doda 100 µL Tritona X-100.

NGS se priprema kao 10 %-tna otopina u PBS-T-u.

Primarno zečje poliklonsko IgG protutijelo na c-Fos priprema se u omjeru 1:400 u 1%-tnom NGS-u i PBS-T-u.

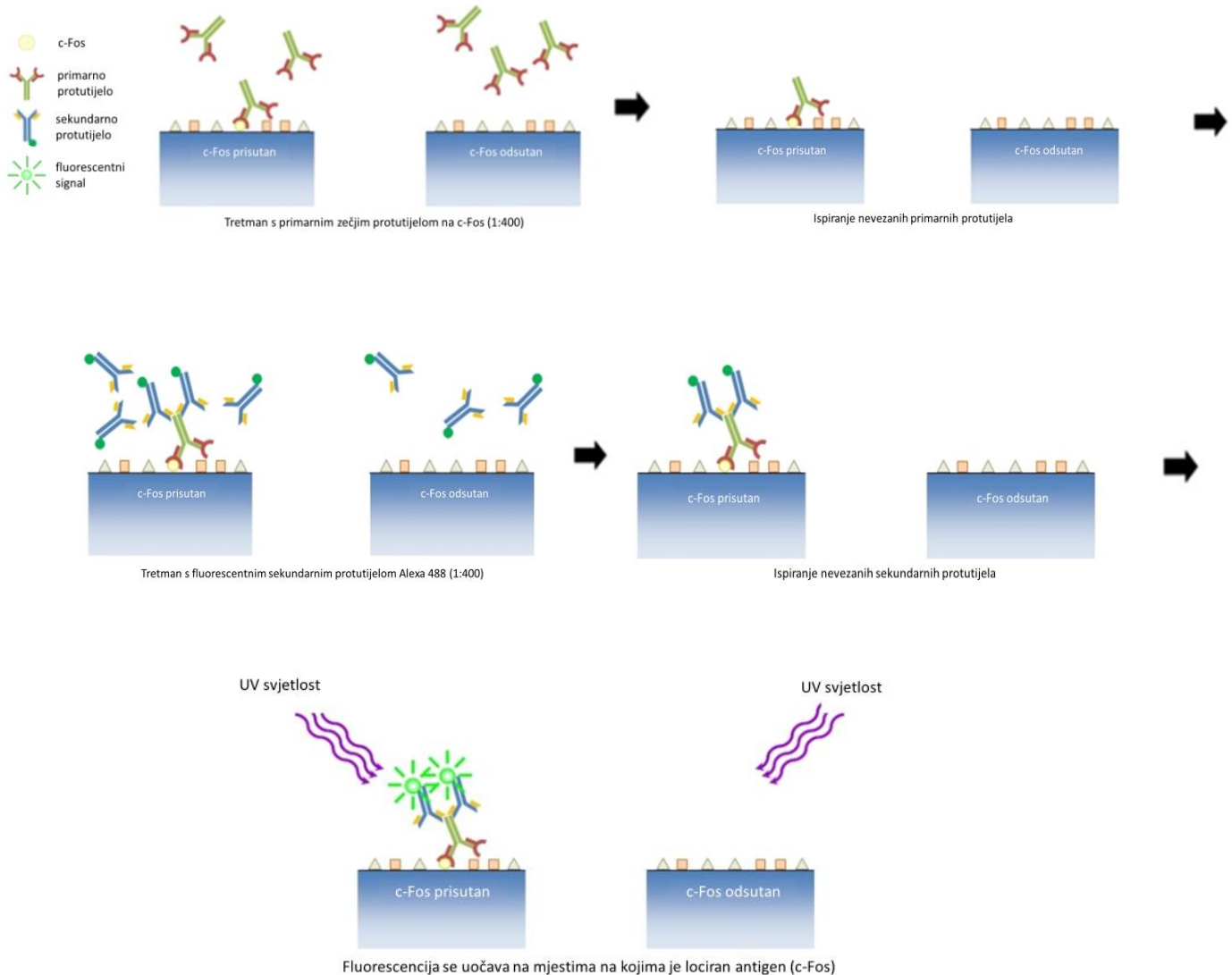
Fluorescentno sekundarno kozje protutijelo Alexa Fluor 488 najprije se centrifugira (Mikro 120, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Njemačka) jednu minutu na 20 000 okretaja, a potom se razrijedi u omjeru 1:400 koristeći 1 %-tni NGS i PBS-T. Nakon razrjeđivanja, smjesa se centrifugira 20 minuta na 13 000 okretaja kako bi se istaložile sve nečistoće i smetnje, a u supernatantu ostalo čisto protutijelo spremno za upotrebu.

### 3.5.3. Imunohistokemija

S ciljem detekcije i lokalizacije mogućega mjesta djelovanja BT-A, u ovom je eksperimentu korištena indirektna metoda imunohistokemije u kojoj se koristi primarno protutijelo specifično na marker neuralne aktivacije c-Fos (na čiju aktivnost djeluje BT-A) i sekundarno protutijelo koje omogućava detekciju c-Fosa preko fluorescencije. Princip ove metode opisan je na Slici 8. Odabrani uzorci lumbalnih dijelova leđne moždine (L4/L5) stavljeni su u jažice s 0,25 % otopinom PBS-T 1x te potom isprani tri puta po pet minuta.

Kako bi se spriječilo nespecifično vezanje primarnog protutijela, nakon ispiranja uzorcima je dodan blok pufer: 10 %-tni NGS, pri čemu slijedi inkubacija u trajanju od sat vremena na sobnoj temperaturi. Po završetku inkubacije uklonjen je blok pufer te su uzorci inkubirani s anti-c-Fos primarnim protutijelom (1:400) preko noći na sobnoj temperaturi. Sljedeći dan uklonjeno je primarno protutijelo (odnosno višak koji se nije vezao za c-Fos) i uzorci su isprani s 0,25 %-tnim PBS-T 1x tri puta po pet minuta. Svrha ispiranja je uklanjanje primarnih protutijela koja se nisu uspjela vezati na c-Fos. Uzorci se potom inkubiraju s fluorescentnim sekundarnim protutijelom Alexa 488 (1:400) koje se specifično veže za primarna anti-c-Fos protutijela. Inkubacija u jažicama traje dva sata na sobnoj temperaturi. S obzirom na osjetljivost sekundarnog protutijela na svjetlost, postupak nanošenja u jažice i inkubacija provodi se u mraku. Uzorci se ponovno isperu s 0,25 %-tnim PBS-T 1x, analogno prethodno opisanom postupku (tri puta po pet minuta), te se nanese na mikroskopska stakalca. Prije prekrivanja pokrovnicom uzorke je potrebno zaštititi medijem za očuvanje fluorescencije *Fluoroshield with DAPI*. Pripremljena stakalca ostavljena su u mraku na sobnoj temperaturi sat vremena, nakon čega su pohranjena u hladnjak do obrade na mikroskopu. Prerezi su vizualizirani fluorescentnim mikroskopom (Olympus BX51, Olympus, Tokyo, Japan) spojenim na digitalnu kameru (Olympus DP-70, Olympus, Tokyo, Japan) i fotografirani koristeći 4x, 10x i 20x povećanje.

Od svake životinje (n = 5-6) uzeta su i obrađena po četiri nasumična L4/L5 prereza, te su snimljene fotografije (ipsilateralna i kontralateralna strana) na fluorescentnom mikroskopu na povećanju od 20x za daljnju analizu. Potom su kvantificirani c-Fos pozitivni neuroni u programskom softveru *Fiji ImageJ* na fotografijama na kojima se vide lamine I i II te V i VI. Za svaki je prerez analiziran broj signala te je za svaku životinju izračunata aritmetička sredina istih. Naposljetku, srednje vrijednosti za lamine I/II i V/VI su zbrojene za pojedinu životinju kako bi se dobio ukupan broj pozitivnih c-Fos neurona na pojedinoj strani leđne moždine.



**Slika 8.** Shematski prikaz indirektna metode imunohistokemije korištene u ovom eksperimentu (prilagođeno prema <https://di.uq.edu.au/community-and-alumni/sparq-ed/cell-and-molecular-biology-experiences/immunofluorescence/background-immunofluorescence>)

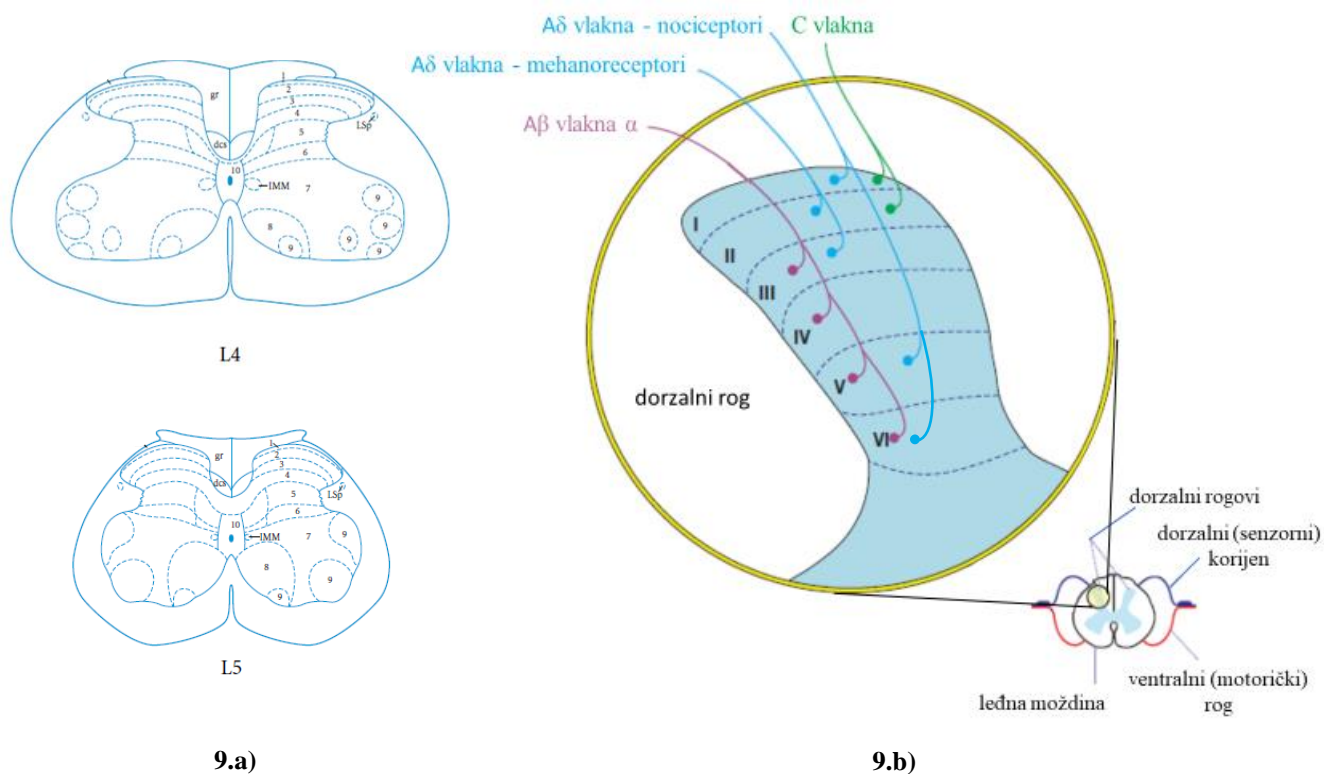
### 3.6. Statistička analiza rezultata

Dobiveni rezultati obrađeni su u programu GraphPad Prism 8 te izraženi kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna pogreška aritmetičke sredine (engl. *standard error of mean*, SEM) i prikazani u obliku stupčastog grafa. Nakon dvosmjerne analize varijanci (engl. *Two-way ANOVA*) razlike između skupina ispitane su Tukey post-hoc testom. Kao statistički značajna vrijednost uzeta je  $p < 0,05$ .

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom diplomskom radu proučavan je utjecaj BT-A na aktivaciju neurona u laminama dorzalnih rogova leđne moždine nakon njegove periferne primjene intraplantarnom injekcijom u stražnju desnu šapu štakora. Kao što je prehodno opisano, dorzalni rogovi leđne moždine smatraju se primarnim mjestom antinociceptivnog djelovanja BT-A. Leđna se moždina sastoji od bijele tvari, odnosno mijeliniziranih živčanih vlakana koji okružuju simetrični stanični matriks sive tvari oblika leptira. Ona pak sadrži tijela neurona, nemijelinizirana vlakna motoneurona i interneurone koji povezuju dvije strane moždine ili dorzalne i ventralne ganglije. Siva tvar formira tri para rogova: dorzalne (koji sadrže osjetne neurone), lateralne (koji sadrže visceralne neurone) i ventralne (koji sadrže motoneurone), a funkcionalno je podijeljena na devet različitih slojeva ili lamina (uz stanice oko centralnog kanala moždine koje se ponekad nazivaju desetom laminom). Lamine I do VI formiraju dorzalne robove i primaju osjetne podražaje te su u kontekstu ovog diplomskog rada najbitnije (<https://www.britannica.com/science/human-nervous-system/The-spinal-cord#ref942331>).

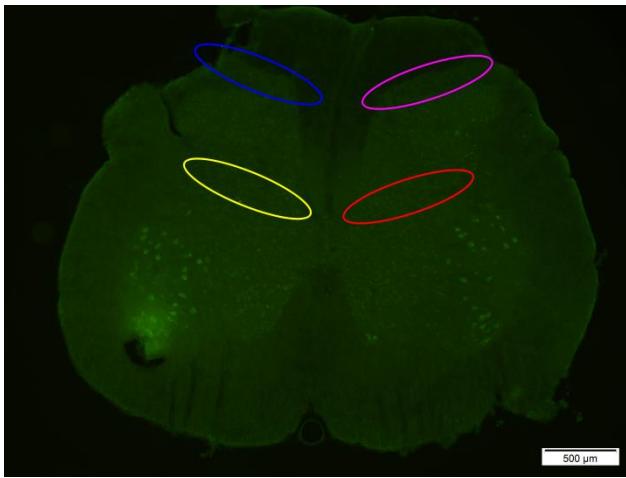
Aktivacija neurona praćena je na modelu upalne boli izazvane karagenanom preko ekspresije c-Fos proteina metodom neizravne imunohistokemije. Analiza je provedena na poprečnim presjecima tkiva leđne moždine na razini L4/L5 lumbalnih segmenata (Slika 9.a) s obzirom da upravo u ovim segmentima osjetna vlakna ishijadičnog živca ulaze stražnjim spinalnim korjenovima u leđnu moždinu. Upravo je za ishijadični živac (koji se proteže od stražnje šape štakora do leđne moždine) dokazano kako posreduje u aksonalnom transportu periferno primijenjenog BT-A (Matak i sur., 2012). Prilikom ulaska u leđnu moždinu A $\delta$ - i C-vlakna skupljaju se u dorzolateralnom funikulu, poznatom kao Lissauerov trakt, nakon čega završavaju u određenim laminama. C-vlakna završavaju u laminama I i II, dok A $\delta$ -vlakna završavaju u površinskim laminama I i II te dubokim laminama V i VI (Slika 9.b) (Paxinos, 2015).



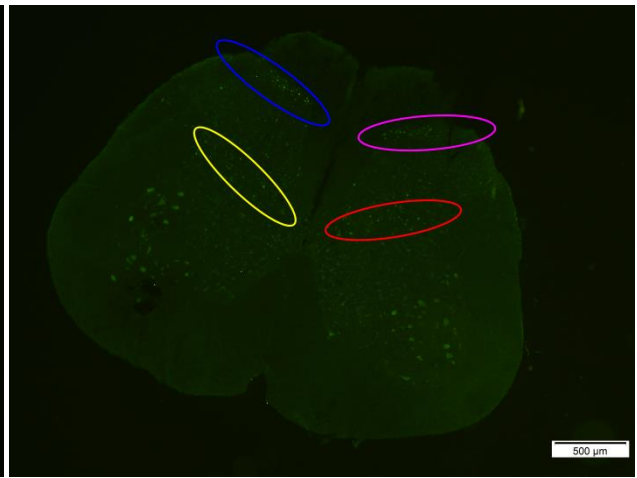
**Slika 9.** a) Shematski prikaz poprečnih prereza leđne moždine štakora koji obuhvaćaju L4 i L5 segmente (Paxinos i Watson, 2004); kratice: dcs=dorzalni kortikospinalni trakt; gr=gracile fasciculus; IMM=intermediomedijalna kolumna; LSp=lateralna spinalna jezgra; lamine su označene brojevima; b) završeci živčanih vlakana u dorzalnom rogu leđne moždine: za nocicepciju su odgovorna Aδ i C vlakna koja završavaju u laminama I, II te V i VI (prilagođeno prema Bullock i Hales, 2013)

U eksperiment su uključene četiri skupine životinja (vidi: 3.4.1. Priprema uzoraka za imunohistokemijsku analizu). Od četiri ispitivane skupine dvije su eksperimentalne, odnosno tretirane s BT-A i.pl., pri čemu je jedna skupina primila anti-BT-A za koji je pretpostavljeno da bi mogao poništiti učinak toksina. Kontrolne skupine tretirane su fiziološkom otopinom umjesto s BT-A. U eksperimentalnoj kontrolnoj skupini (kao i u skupinama tretiranim s BT-A) upalna bol izazvana je primjenom karagenana.

Imunohistokemijski je analiziran broj c-Fos pozitivnih neurona na po 4 nasumično odabrana L4/L5 prereza životinja iz svake skupine (n = 5-6). Prikaz prereza nalazi se na Slici 10.



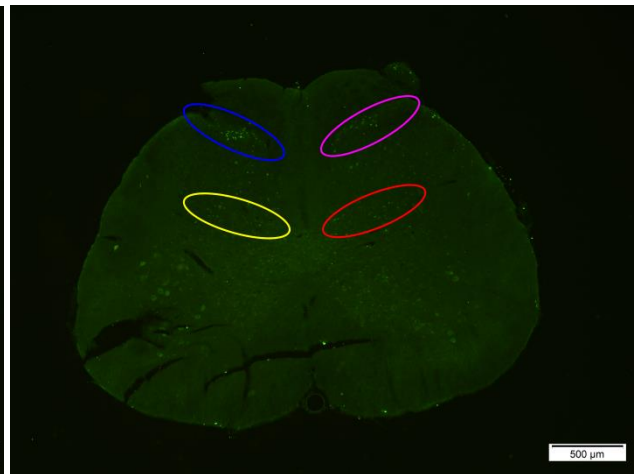
**F.O. / KS 2 i.j./10 μl / F.O.**



**F.O. / KS 2 i.j./10 μl / KAR. 2%**

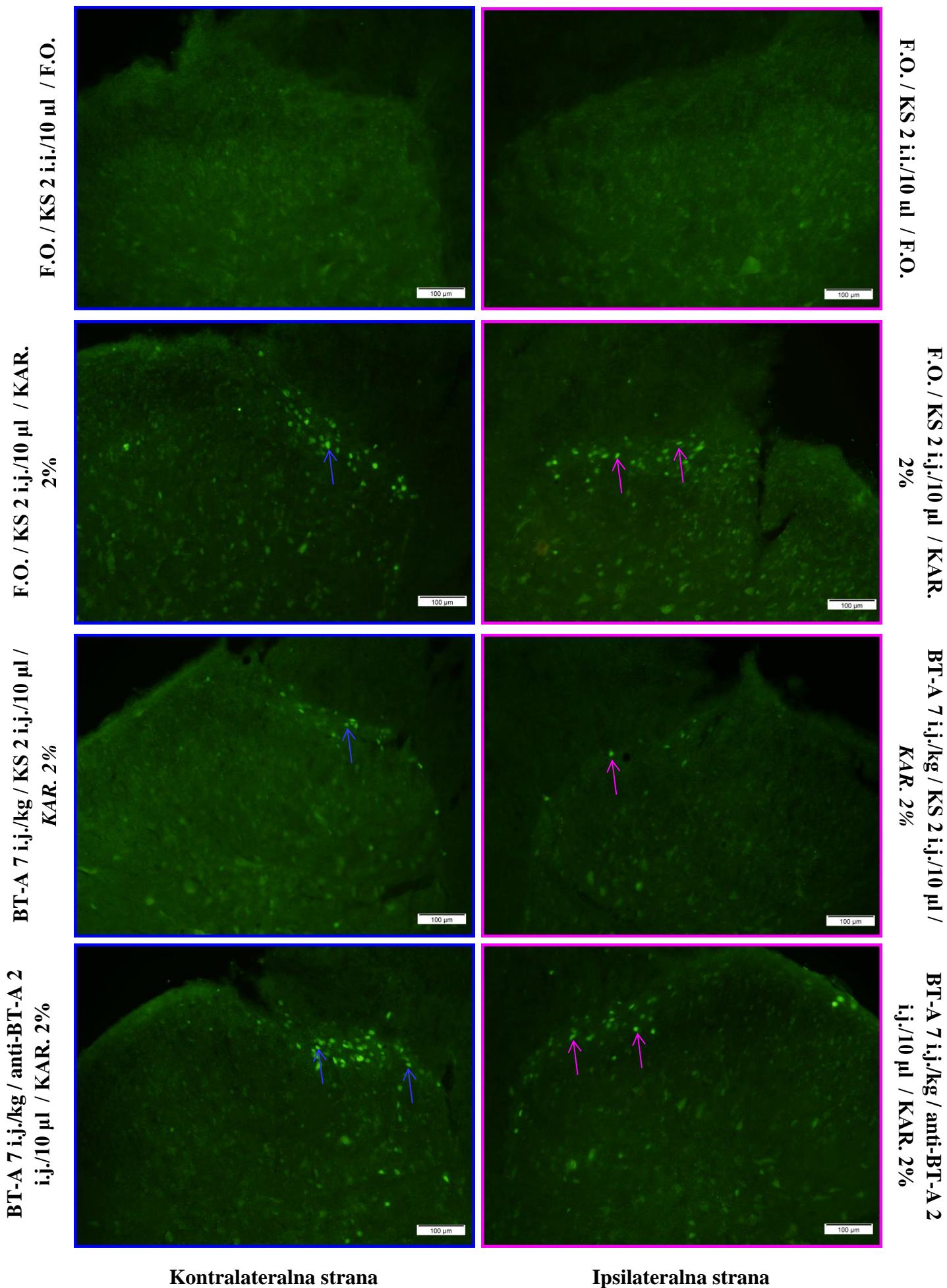


**BT-A 7 i.j./kg / KS 2 i.j./10 μl / KAR. 2%**

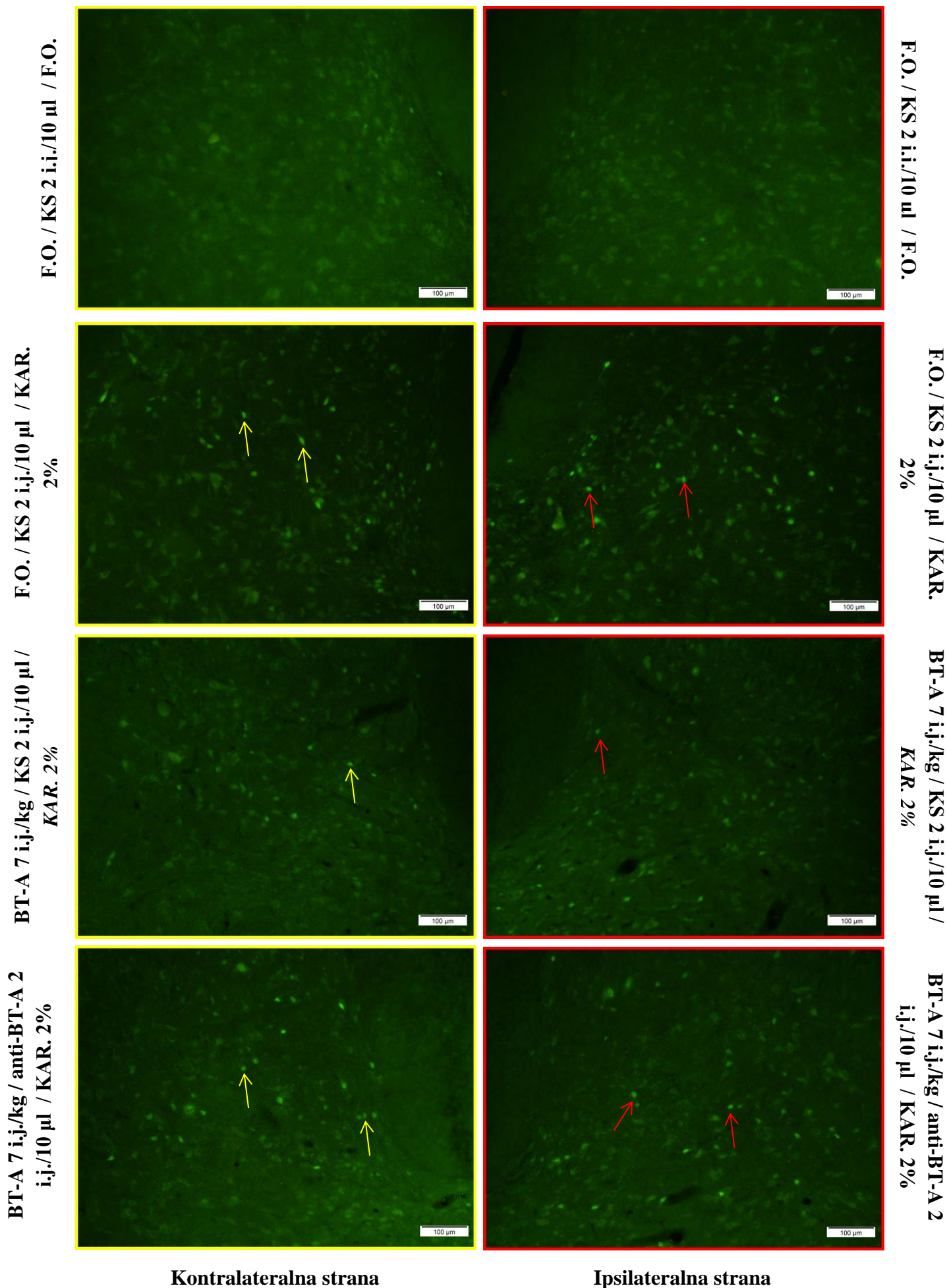


**BT-A 7 i.j./kg / anti-BT-A 2 i.j./10 μl / KAR. 2%**

**Slika 10.** a) Prikaz imunoreaktivnosti c-Fos pozitivnih neurona u poprečnim presjecima leđne moždine (dorzalni rog). Plavom bojom označena su područja lamina I i II na kontralateralnoj (lijevoj) strani, dok su ljubičastom bojom označena područja lamina I i II na ipsilateralnoj (desnoj) strani. Žutom bojom označena su područja lamina V i VI na kontralateralnoj (lijevoj) strani, dok su crvenom bojom označena područja lamina V i VI na ipsilateralnoj (desnoj) strani. Povećanje 4x. (skala 500μm). *Legenda: BT-A – botulinum toksin A, KS – konjski serum, anti-BT-A – antitoksin, KAR – karagenan*



Slika 10. b) Prikaz imunoreaktivnosti c-Fos pozitivnih neurona u poprečnim presjecima leđne moždine koji obuhvaćaju površinske lamine I i II. Strelicama su označeni c-Fos pozitivni neuroni. Povećanje 20x (skala 100 µm).



Kontralateralna strana

Ipsilateralna strana

**Slika 10. c)** Prikaz imunoreaktivnosti c-Fos pozitivnih neurona u poprečnim presjecima leđne moždine koji obuhvaćaju dubinske lamine V i VI. Strelicama su označeni c-Fos pozitivni neuroni. Povećanje 20x (skala 100 µm).



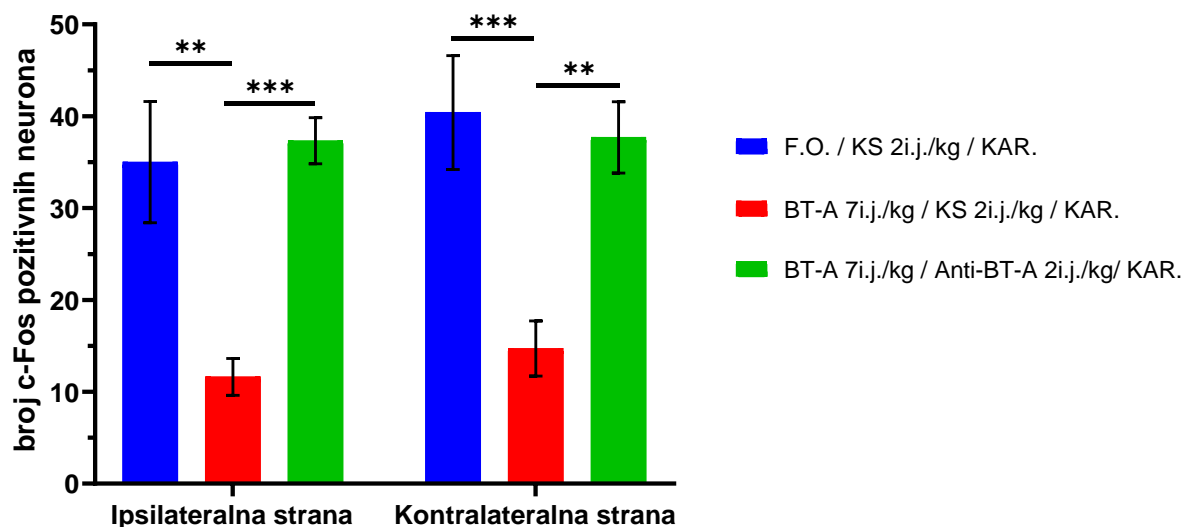
U programu *Fiji ImageJ* provedena je kvantitativna analiza c-Fos pozitivnih neurona na fotografijama prereza pri povećanju 20X. Dobivene vrijednosti za pojedinu životinju su uprosječene te su kasnije srednje vrijednosti za lamine I/II i V/VI na pojedinoj strani leđne moždine zbrojene. Tako se za pojedinu životinju dobio ukupan broj pozitivnih c-Fos neurona na pojedinoj strani leđne moždine. U daljnjem tekstu ipsilateralno označava stranu na kojoj je primijenjen BT-A, a kontralateralno stranu suprotnu tome. Vrijednosti dobivene kvantitativnom analizom prikazane su u Tablici 4. Rezultati su potom statistički obrađeni te prikazani grafički na Slici 11.

**Tablica 4.** Prikaz rezultata kvantitativne analize c-Fos ekspresije izraženih kao broj c-Fos pozitivnih neurona.

tretman	životinje	ipsilateralna strana	kontralateralna strana
<b>Skupina A:</b> <i>F.O. / KS 2 i.j./10 µl / F.O.</i>	A1	0.00	0.00
	A2	0.00	0.00
	A3	0.00	0.00
	A4	0.00	0.00
	A5	0.00	0.00
<b>Srednja vrijednost</b>	<b>A1-A5</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>
<b>Skupina B:</b> <i>F.O. / KS 2 i.j./10 µl / KAR. 2%</i>	B1	23.00	29.75
	B2	35.25	40.00
	B3	22.25	35.50
	B4	58.75	64.25
	B5	35.75	32.50
<b>Srednja vrijednost</b>	<b>B1-B5</b>	<b>35.00</b>	<b>40.40</b>
<b>Skupina C:</b> <i>BT-A 7 i.j./kg / KS 2 i.j./10 µl / KAR. 2%</i>	C1	20.00	25.00
	C2	13.25	22.75
	C3	9.75	10.50
	C4	8.25	8.50
	C5	12.50	13.25
	C6	6.00	8.25
<b>Srednja vrijednost</b>	<b>C1-C6</b>	<b>11.63</b>	<b>14.71</b>
<b>Skupina D:</b> <i>BT-A 7 i.j./kg / anti-BT-A 2 i.j./10 µl / KAR. 2%</i>	D1	34.00	38.00
	D2	30.00	29.67
	D3	40.00	28.00
	D4	36.00	52.00
	D5	48.00	45.75
	D6	36.00	32.75
<b>Srednja vrijednost</b>	<b>D1-D6</b>	<b>37.33</b>	<b>37.69</b>

*Legenda: BT-A – botulinum toksin A, KS – konjski serum, anti-BT-A – antitoksin, KAR – karagenan*

## C-Fos ekspresija (dorzalni rog leđne moždine)



**Slika 11.** Grafički prikaz rezultata c-Fos ekspresije u dorzalnom rogu leđne moždine. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost c-Fos pozitivnih neurona u pojedinoj eksperimentalnoj skupini na pojedinoj strani leđne moždine  $\pm$  SEM. Kratice: F.O. = fiziološka otopina, BT-A = botulinum toksin tip A, KS = konjski serum, Anti-BT-A = antitoksin za BT-A, KAR. = karagenan, i.j. = internacionalna jedinica. Kako su rezultati za skupinu tretiranu s F.O./KS/F.O. bili jednaki nuli, nisu prikazani na grafu. \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$

Zbog svojih specifičnih svojstava i mogućnosti primjene u terapiji boli, analgetsko djelovanje BT-A predmet je brojnih istraživanja s ciljem otkrivanja mehanizma i točnog mjesta djelovanja. Nekad se pretpostavljalo da BT-A djeluje antinociceptivno sprječavanjem periferne senzitivacije i otpuštanja neuropeptidnih neurotransmitora poput tvari P i CGRP iz primarnih senzornih neurona, što bi indirektno vodilo k smanjenju središnje senzitivacije neurona dorzalnih rogova leđne moždine. Nasuprot ovoj uvriježenoj hipotezi novija istraživanja pokazuju da je antinociceptivno djelovanje BT-A središnjeg porijekla s dorzalnim rogom leđne moždine kao primarnim mjestom djelovanja. Naime, rezultati tih istraživanja pokazuju kako BT-A smanjuje upalnu hiperalgeziju, ali ne i lokalni edem i ekstravazaciju proteina induciranu injekcijom karagenana ili kapsaicina u stražnju šapu štakora. Uzimajući u obzir bihevioralne eksperimente vezane za zrcalnu bol, činjenicu kako je upala periferni fenomen te dokazanu enzimatsku aktivnost BT-A (cijepanje SNAP-25) na mjestu različitom od mjesta njegove primjene, pretpostavilo se da BT-A putuje aksonalnim transportom do centralnih neurona i motoneurona gdje bi mogao interferirati s procesima središnje senzitivacije. Teza o aksonalnom transportu potvrđena je ispitivanjima u kojima je kolhicin, blokator aksonalnoga transporta, nakon ipsilateralne primjene u ishijadični živac u odnosu na

toksin inhibirao njegovo antinociceptivno djelovanje na obje strane tijela (Bach i Lacković, 2009). Prvi eksperimentalni dokazi kojima se ukazalo na središnje antinociceptivno djelovanje BT-A obuhvaćali su, prilikom središnje intratekalne primjene, brži nastup djelovanja te potrebu za nižim dozama BT-A u usporedbi s perifernom primjenom. Konkretno je to pokazano na formalinskom modelu upalne boli gdje je najmanja djelotvorna doza toksina bila 7 puta manja od najmanje djelotvorne periferne doze (0,5 i.j./kg intratekalno vs. 3,5 i.j./kg periferno), a nastup djelovanja uslijedio je 24 sata nakon intratekalne primjene u odnosu na pet dana nakon periferne primjene. Slični rezultati dobiveni su i na modelu eksperimentalne neuropatske boli (Bach-Rojecky, 2006). Kasnija istraživanja koja su uključivala supraspinalnu primjenu BT-A (npr. u *cisternu magnu*) pokazala su kako je toksin primijenjen ovim putem neučinkovit na bol na periferiji, što također ide u prilog tezi o središnjem djelovanju na razini leđne moždine. U istom je istraživanju pokazano da intratekalna primjena  $\mu$ -opioidnog antagonista naloksonazina i GABA-A antagonista bikukulina poništava antinociceptivni učinak periferno primijenjenog BT-A na modelu zrcalne boli uzrokovane intramuskularnom primjenom karagenana, dok supraspinalna primjena bikukulina u *cisternu magnu* i naloksonazina u moždane komore na ovo nema utjecaja (Drinovac Vlah, 2017). Dakle, antinociceptivno djelovanje BT-A na upalnu i neuropatsku bol uključuje „gornje” dijelove nociceptivnog neurona, gdje toksin dolazi retrogradnim transportom nakon periferne primjene. Pritom BT-A učinkovito smanjuje bolnu hipersenzitivnost, ali ne mijenja prag akutne boli. Iako je potvrđeno kako je antinociceptivno djelovanje BT-A posredovano preko SŽS, precizno mjesto djelovanja i mehanizam BT-A u SŽS još uvijek nisu istraženi do kraja (Bach-Rojecky, 2006; Drinovac Vlah i Bach-Rojecky, 2020).

Zrcalna bol, koja se obično prezentira kao mehanička alodinija, uočena je u raznim vrstama životinjskih modela boli u kojima su različite unilateralne ozljede smanjile prag boli na kontralateralnoj strani. Pritom je odgovor na kontralateralnoj strani obično slabiji i kraći u odnosu na ipsilateralnu stranu. Neki od predloženih mehanizama koji bi mogli uzrokovati širenje boli na kontralateralnu stranu u odnosu na ozljedu su širenje bolnog podražaja kroz komisurne interneurone koji sinapsama spajaju dvije strane leđne moždine, otpuštanje neuromodulatora koji nakon cirkulacije krvlju i cerebrospinalnom tekućinom dolaze do i utječu na kontralateralne živčane završetke te otpuštanje proupalnih citokina od strane spinalnih glija stanica. Dakle, zrcalna bol posljedica je središnje senzitivacije. Antinociceptivno djelovanje BT-A istraženo je u nekoliko različitih modela boli u kojima je unilateralna ozljeda tkiva potaknula dugodjelujuću bilateralnu bol i hipersenzitivnost. U ovim

je modelima prihvaćeno da je razvoj akutne boli, njezino širenje na kontralateralnu stranu i prelazak u kroničnu bol posredovano složenim spinalnim i supraspinalnim mehanizmima (Drinovac Vlah i Bach-Rojecky, 2020).

Bilateralni učinak BT-A dosad je dokazan u modelima zrcalne boli uzrokovane intramuskularnom primjenom kisele fiziološke otopine, modelu trigeminalne neuropatije uzrokovane podvezivanjem infraorbitalnog živca štakora i polineuropatije nakon sistemske primjene paklitaksela i streptozotocina, kao i upalnom modelu boli izazvanom Freundovim kompletnim adjuvansom te intramuskularnom primjenom karagenana u mišić lista, kao i njegovom intraplantarom primjenom. Ovi modeli obuhvaćaju upalnu, neupalnu i neuropatsku bol pa se stoga može zaključiti kako bilateralni učinak BT-A nije uzročno povezan s određenim tipom boli. Također je primijećeno i kako periferno primijenjen BT-A djeluje bilateralno samo ako je primijenjen na ipsilateralnu stranu, odnosno na stranu na kojoj je uzrokovana ozljeda. Ako je primijenjen kontralateralno, BT-A je djelovanje ispoljavao samo na toj strani ili uopće nije djelovao. S obzirom na to može se zaključiti kako bilateralni učinak BT-A na bol ovisi o tipu i mehanizmima širenja ozljede na kontralateralnu stranu u modelu boli (intenzitet i tvar korištena za oštećivanje tkiva, vremenski tijek razvoja bilateralne ozljede...). Uočena unilateralna aktivnost ili njezin kompletan izostanak nakon kontralateralne injekcije BT-A pobudila je sumnje u mogućnost transporta BT-A na kontralateralnu stranu leđne moždine, iako su istraživanja na mišićnom tkivu ukazala na njegovu sposobnost da putuje dalje od prve sinapse. Upravo zbog ove sposobnosti prelaska kao mogućnost se ne može isključiti da BT-A ispoljava svoj učinak nakon transcitoze do kontralateralne strane dorzalnog roga. Neki od mogućih mehanizama transcitoze obuhvaćaju direktan prijenos kroz komisuralne interneurone na kontralateralnu stranu leđne moždine i/ili indirektan prijenos pomoću cirkulirajućih sinaptičkih neuronalnih medijatora ili medijatora izlučenih od strane glija stanica dok istovremeno jedan dio toksina ostaje lokaliziran na ipsilateralnoj strani. Bilateralno djelovanje unilateralno primijenjenog BT-A također podupire teoriju o njegovom središnjem djelovanju (Matak i sur., 2019; Drinovac Vlah i Bach-Rojecky, 2020).

Cilj ovog rada, koji je dio većeg istraživačkog projekta, bio je praćenjem ekspresije c-Fos detaljnije istražiti točno mjesto djelovanja BT-A u SŽS na modelu bilateralne upalne boli nakon periferne intraplantarne primjene te istovremeno razjasniti djeluje li BT-A doista na kontralateralnoj strani leđne moždine. Sukladno prethodno provedenim istraživanjima i dostupnoj literaturi, pretpostavka je da BT-A u SŽS djeluje na razini leđne moždine na obje

strane (ipsilateralnoj i kontralateralnoj) u odnosu na stranu primjene BT-A (Shin i sur., 2013; Matak i sur., 2019; Drinovac Vlah i Bach-Rojecky, 2020).

Aktivnost nociceptivnih aferentnih završetaka u leđnoj moždini koja se javlja kao odgovor na karagenanski stimulus ispitana je mjerenjem ekspresije imunofluorescentno obilježenog c-Fos proteina. Slika 10 pod a), b) i c) prikazuje točkastu zelenu c-Fos imunoreaktivnost u L4/L5 segmentima leđne moždine tri sata nakon aplikacije karagenana, ukazujući na pojačanu aktivnost nociceptivnih aferentnih završetaka na obje strane leđne moždine nakon uzrokovanja upalne boli perifernom bilateralnom i.pl. injekcijom karagenana. BT-A je, prethodno karagenanu, primijenjen unilateralno intraplantarno u stražnju desnu šapu štakora. Tri sata nakon karagenanske injekcije, prosječne vrijednosti c-Fosa bile su vidno povećane u odnosu na kontrolu. Porast c-Fos imunoreaktivnosti na ipsilateralnoj je strani uvelike smanjen djelovanjem BT-A u odnosu na eksperimentalnu kontrolu te također u odnosu na skupinu tretiranu s anti-BT-A (navedene razlike bile su statistički značajne s pripadajućim vrijednostima  $p=0,0014$  i  $p=0,0003$ ). Uočen je sličan trend i na kontralateralnoj strani, gdje su se statistički značajnima pokazali utjecaj BT-A na smanjenje ekspresije c-Fosa u odnosu na kontrolnu skupinu kojoj je izazvana upala ( $p=0,0005$ ) i u odnosu na skupinu tretiranu s anti-BT-A ( $p=0,0010$ ). Ovi rezultati ukazuju na to da BT-A nakon ipsilateralne primjene uzrokuje značajnu inhibiciju pojačane aktivnosti nociceptivnih živčanih vlakana u dorzalnom rogu uzrokovane primjenom karagenana. Navedeni učinak vidljiv je ne samo na ipsilateralnoj, već i na kontralateralnoj strani leđne moždine, što potvrđuje pretpostavku o bilateralnom antinociceptivnom djelovanju BT-A u modelu upalne boli. Međutim, ovim je eksperimentom pokazano i da antitoksin smanjuje bilateralni učinak BT-A, što upućuje na mogućnost transcitoze, odnosno izlaska BT-A iz središnje grane aferentnog vlakna i utjecaja na do sada neidentificirane neurone u dorzalnom rogu.

Eksperimentalni dio ovog diplomskog rada nastavak je bihevioralnih ispitivanja kojima je također pokazano da BT-A ispoljava bilateralni učinak, odnosno da smanjuje mehaničku hiperosjetljivost na strani primjene, ali i na suprotnoj netretiranoj strani (neobjavljeni rezultati).

## 5. ZAKLJUČCI

Iako se nekad smatralo kako BT-A svoj antinociceptivni učinak ostvaruje isključivo na periferiji (mjestu ozljede) inhibicijom lučenja neurotransmitora, sve veći broj eksperimentalnih dokaza ukazuje na središnji živčani sustav kao glavno mjesto djelovanja. Iako se ne može isključiti kako periferno primijenjen BT-A smanjuje perifernu senzitivaciju, ipak je glavno mjesto djelovanja na razini prve sinapse u bolnom putu, točnije u dorzalnim rogovima leđne moždine do kuda BT-A dolazi retrogradnim aksonalnim transportom. Određena istraživanja pokazala su kako BT-A djeluje ne samo na strani na kojoj je primijenjen, već smanjuje bol i na kontralateralnoj strani.

Rezultati ovog diplomskog rada potkrepljuju prethodno navedene tvrdnje o središnjem djelovanju BT-A na upalnu bol u području inervacije ishijadičnim živcem. Karagenan je, sukladno očekivanjima, u ovoj regiji izazvao upalnu bol koja je indirektno kvantitativno praćena pomoću c-Fosa, markera neuronalne aktivacije. Budući da je karagenan primijenjen u obje šape štakora, ekspresija c-Fosa u leđnoj moždini mjerena je obostrano. Nakon što je primijenjen intraplantarno u stražnju desnu šapu štakora, BT-A (7 i.j./kg) je u L4/L5 segmentima leđne moždine statistički značajno smanjio ekspresiju c-Fosa, što upućuje na aksonalni transport BT-A do leđne moždine koja je mjesto djelovanja BT-A u središnjem živčanom sustavu.

Također je pokazano kako toksin ostvaruje bilateralan učinak na smanjenje neuronalne aktivacije u karagenanskom modelu upalne boli s obzirom da je doveo do značajnog smanjenja c-Fos pozitivnih neurona ne samo na ipsilateralnoj strani leđne moždine, već i na strani kontralateralnoj od strane primjene toksina. Zanimljivo, središnje (intratekalno) primijenjen antitoksin spriječio je učinak BT-A na ipsilateralnoj, ali i na kontralateralnoj strani.

Zaključno, ovim radom potkrepljena su dosadašnja saznanja o središnjem mjestu antinociceptivnog djelovanja BT-A, kao i o njegovom bilateralnom učinku na bol. Iako dosadašnja istraživanja upućuju na povezanost s GABA-ergičnim i opioidnim sustavima uključenima u inhibiciju transmisije bolnih impulsa na razini leđne i produžene moždine, točan mehanizam antinociceptivnog djelovanja BT-A još nije utvrđen, kao ni mehanizam djelovanja BT-A na suprotnoj strani leđne moždine u odnosu na stranu primjene. Razjašnjavanje ovih fenomena predstavlja izazov za daljnja istraživanja.

## 6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

ACh – acetilkolin

ASIC – kanal osjetljiv na kiselinu, eng. *acid sensing ion channel*

AMPA – alfa-amino -3-hidroksil-5-metil-4-izoksazol propionska kiselina

ATP – adenzin trifosfat

BT, BoNT – botulinum toksin

CGRP – peptid srodan genu za kalcitonin, eng. *Calcitonin gene-related peptide*

FDA – Agencija za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država, eng. *Food and Drug Administration*

IEG – gen ranog odgovora, eng. *immediate early gene*

i.j. – internacionalna jedinica (eng. IU)

i.pl. – intraplantarno

i.t. – intratekalno

LD50 – koncentracija tvari koja ubije 50% životinja kojima je tvar primijenjena

NMDA – N-metil-D-aspartat

NAPs – netoksični proteini povezani s neurotoksinom, eng. *neurotoxin associated proteins*

NO – dušik (II) oksid

NSAID – nesteroidni protuupalni lijekovi, eng. *non-steroid antiinflammatory drugs*

PACAP – hipofizni polipeptid koji aktivira adenilat ciklazu, eng. *pituitary adenylate cyclase activating peptide 38*

PBS – eng. *Phosphate-buffered saline*

PTC – eng. *progenitor toxin complex*

SEM – standardna pogreška aritmetičke sredine, eng. *standard error of mean*

SNARE – eng. *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*

SV2 – eng. *Synaptic vesicle glycoprotein*

Syt – sinaptotagmin

SŽS – središnji živčani sustav

TRPV1 – vaniloidni (kapsaicinski) receptor 1, eng. *Transient receptor potential vanilloid subtype 1*

VAMP – sinaptobrevin , eng. *vesicle-associated membrane protein*



## 7. LITERATURA

Bach-Rojecky L. Antinociceptivno djelovanje botulinum toksina tipa A, Doktorska disertacija. 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(2), 234-238.

Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 17: Clostridium botulinum, 2017., <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-17-clostridium-botulinum>, pristupljeno 11.6.2022.

Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 2009, 139(2), 267-284.

Human nervous system – the spinal cord / Britannica, 2022., <https://www.britannica.com/science/human-nervous-system/The-spinal-cord#ref942331>, pristupljeno 20.6.2022.

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

Choudhury S, Baker MR, Chatterjee S, Kumar H. Botulinum Toxin: An Update on Pharmacology and Newer Products in Development. *Toxins (Basel)*, 2021, 13(1), 58.

Čulo M, Morović-Vergles J. Etiologija i patogeneza boli u reumatskim bolestima. *Reumatizam*, 2016, 63(1), 18-22.

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

Drinovac Vlah V, Bach-Rojecky L. What have we learned about antinociceptive effect of botulinum toxin type A from mirror-image pain models? *Toxicon*, 2020, 185, 164-173.

Elovic EP, 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.

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

Giroto D, Bajek G, Ledić D, Stanković B, Vukas D, Kolbah B, et al. Patofiziologija bolnog puta. *Medicina Fluminensis*, 2012, 48(3), 271-277.

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

Gregory NS, Harris AL, Robinson CR, Dougherty PM, Fuchs PN, Sluka KA. An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. *J Pain*, 2013, 14(11), 1255-1269.

Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija (trinaesto izdanje). Medicinska naklada, Zagreb, 2017, str. 621-629.

Harris JA. Using c-fos as a neural marker of pain. *Brain Res Bull*, 1998, 45(1), 1-8.

Hoffman GE, Smith MS, Verbalis JG. c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol*, 1993, 14(3), 173-213.

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

Jergová S, Cížková D, Orendáčová J, Cízek M, Marsala J. Localization of c-Fos protein in the rat spinal cord after carrageenan treatment. *Acta Histochem*, 2002, 104(4), 381-385.

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

Kovács KJ. c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem Int*, 1998, 33(4), 287-297.

Matak I, Bölskei K, Bach-Rojecky L, Helyes Z. Mechanisms of Botulinum Toxin Type A Action on Pain. *Toxins (Basel)*, 2019, 11(8), 459.

Matak I, Riederer P, Lacković Z. Botulinum toxin's axonal transport from periphery to the spinal cord. *Neurochem Int*, 2012, 61(2), 236-239.

Mediatelly baza lijekova (cjelokupna baza podataka o lijekovima dostupnim u Hrvatskoj. Izvori: HALMED, HZZO, EMA), 2021. <https://mediately.co/hr>, pristupljeno 15.6.2022.

Morović-Vergles, J. Patofiziologija kronične boli. *Reumatizam*, 2007, 54 (2), 28-31.

MSD priručnik dijagnostike i terapije: Bol, 2014., <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/neurologija/bol>, pristupljeno 17.6.2022.

MSD priručnik dijagnostike i terapije: Botulizam, 2014., <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/infektologija/anaerobne-bakterije/botulizam>, pristupljeno 12.6.2022.

Paxinos G. The Rat Nervous System (Fourth Edition). Cambridge, Academic Press, 2015, str. 78-82, 712.

Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates 5th Edition. Cambridge, Academic Press, 2004, Figure 165.

Pirazzini M, Rossetto O, Eleopra R, Montecucco C. Botulinum Neurotoxins: Biology, Pharmacology, and Toxicology. *Pharmacol Rev*, 2017, 69(2), 200-235.

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

Radoš Filipović M. Botulinum toksin tip A - farmakološka svojstva i terapijska primjena, završni specijalistički rad. Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2019. 33-35.

Rossetto O, Pirazzini M, Montecucco C. Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12(8), 535-549.

Shin MC, Yukihiro T, Ito Y, Akaike N. Antinociceptive effects of A1 and A2 type botulinum toxins on carrageenan-induced hyperalgesia in rat. *Toxicon*, 2013, 64, 12-19.

Terminology / International Association for the Study of Pain, 2021. <https://www.iasp-pain.org/resources/terminology/>, pristupljeno 8.6.2022.

## 8. SAŽETAK / SUMMARY

Botulinum toksin tipa A (BT-A) više od 30 godina koristi se u terapiji različitih kliničkih stanja praćenih mišićnom spastičnošću. Na različitim eksperimentalnim modelima upalne i neuropatske boli uočeno je njegovo dugotrajno antinociceptivno djelovanje nakon jednokratne periferne primjene, što ga uz malen broj nuspojava razlikuje od ostalih sistemskih analgetika u trenutnoj primjeni. Dosad su provedena brojna pretklinička i klinička istraživanja s ciljem razjašnjavanja točnog mehanizma i mjesta djelovanja toksina, što bi omogućilo proširenje njegovih indikacija na brojna bolna stanja.

Usprkos općeprihvaćenoj teoriji o perifernom inhibitornom djelovanju BT-A na egzocitozu neurotransmitora na završetcima senzornih neurona, novija istraživanja ukazuju na središnje djelovanje toksina, najvjerojatnije na razini dorzalnog roga leđne moždine kamo periferno primijenjen BT-A dolazi retrogradnim aksonalnim transportom. Također postoje dokazi o bilateralnom antinociceptivnom djelovanju BT-A nakon njegove unilateralne periferne primjene.

Cilj ovog diplomskog rada bio je potvrditi ove navode na modelu bilateralne upalne boli uzrokovane injiciranjem karagenana u stražnje šape mužjaka štakora soja Wistar. Jedna je skupina životinja prethodno tretirana s BT-A u dozi 7 i.j./kg u stražnju desnu šapu, dok je druga skupina uz BT-A primila i antitoksin za BT-A (anti-BT-A). Kontrolnim skupinama injicirana je fiziološka otopina umjesto BT-A, a u jednoj od njih primjenom fiziološke otopine umjesto karagenana izbjegnuto je izazivanje upale. Imunohistokemijski je praćena ekspresija markera neuronalne aktivacije c-Fosa u poprečnim L4/L5 presjecima leđne moždine štakora.

Rezultati pokazuju kako, sukladno očekivanjima, karagenan dovodi do bilateralne aktivacije neurona u leđnoj moždini dok unilateralna primjena BT-A smanjuje istu na obje strane leđne moždine. Pritom je statistički značajno smanjenje ekspresije c-Fosa zabilježeno u odnosu na kontrolnu skupinu i na skupinu tretiranu s anti-BT-A na ipsilateralnoj, ali i na kontralateralnoj strani leđne moždine. Ovo je još jedan u nizu dokaza o središnjem mjestu antinociceptivnog djelovanja BT-A, pri čemu se ne može isključiti mogući transinaptički prijenos BT-A u druge neurone/stanice uključene u proces nocicepcije na razini leđne moždine.

## SUMMARY

Botulinum toxin type A (BTX-A) has been used to treat numerous clinical conditions characterised by muscle spasticity for years. Long-term antinociceptive effect of BTX-A after its single peripheral application has been reported in various experimental models of inflammatory and neuropathic pain. This, combined with its low side effects frequency differs BT-A from other currently used systemic painkillers. Until now, many preclinical and clinical studies have been conducted with the goal of discovering BT-A's exact mechanism and site of action in mind, which would allow for the expansion of current indications to many other pain conditions.

In contrast to generally accepted theory of BTX-A's peripheral suppression of neurotransmitters release from sensory nerve endings, the results of several recent researches suggest its central site of action, most likely at the dorsal horn of spinal cord level, where peripherally applied BTX-A is delivered by retrograde axonal transport. There is also evidence that BTX-A has bilateral antinociceptive effect after its unilateral peripheral application.

The goal of this master's thesis was to confirm these statements using inflammatory pain model where pain is inflicted by carrageenan injection into hindpaws of male Wistar rats. One group of animals was pretreated with a BTX-A dose of 7 i.u./kg, while another group was treated with BTX-A antitoxin (anti-BTX-A) alongside BTX-A. Control groups have received saline injection (0,9 % NaCl) instead of BTX-A and one of them was treated with saline instead of carrageenan in an attempt to avoid inflammation. Expression of c-Fos (neuronal activity marker), which was used as indirect pain indicator, was immunohistochemically examined in L4/L5 cross sections of rat spinal cord.

The results show that, in line with our expectations, carrageenan is enabling bilateral activation of spinal neurons while BTX-A reduced this activation on both sides of the spinal cord. Statistically significant reduction of c-Fos expression was recorded in comparison with control group and with experimental group treated with anti-BTX-A on both the ipsilateral and contralateral side of spinal cord. This is just another proof that BTX-A is exerting its antinociceptive effects centrally, with both sides of spinal cord as its site of action.

## UTJECAJ BOTULINUM TOKSINA TIP A NA AKTIVACIJU NEURONA LEĐNE MOŽDINE U MODELU UPALNE BOLI

Valentina Meglič

### SAŽETAK

Botulinum toksin tipa A (BT-A) više od 30 godina koristi se u terapiji različitih kliničkih stanja praćenih mišićnom spastičnošću. Na različitim eksperimentalnim modelima upalne i neuropatske boli uočeno je njegovo dugotrajno antinociceptivno djelovanje nakon jednokratne periferne primjene, što ga uz malen broj nuspojava razlikuje od ostalih sistemskih analgetika u trenutnoj primjeni. Dosad su provedena brojna pretklinička i klinička istraživanja s ciljem razjašnjavanja točnog mehanizma i mjesta djelovanja toksina, što bi omogućilo proširenje njegovih indikacija na brojna bolna stanja. Usprkos općeprihvaćenoj teoriji o perifernom inhibitornom djelovanju BT-A na egzocitozu neurotransmitora na završecima senzornih neurona, novija istraživanja ukazuju na središnje djelovanje toksina, najvjerojatnije na razini dorzalnog roga leđne moždine kamo periferno primijenjen BT-A dolazi retrogradnim aksonalnim transportom. Također postoje dokazi o bilateralnom antinociceptivnom djelovanju BT-A nakon njegove unilateralne periferne primjene. Cilj ovog diplomskog rada bio je potvrditi ove navode na modelu bilateralne upalne boli uzrokovane injiciranjem karagenana u stražnje šape mužjaka štakora soja Wistar. Jedna je skupina životinja prethodno tretirana s BT-A u dozi 7 i.j./kg u stražnju desnu šapu, dok je druga skupina uz BT-A primila i antitoksin za BT-A (anti-BT-A). Kontrolnim skupinama injicirana je fiziološka otopina umjesto BT-A, a u jednoj od njih primjenom fiziološke otopine umjesto karagenana izbjegnuto je izazivanje upale. Imunohistokemijski je praćena ekspresija markera neuronalne aktivacije c-Fosa u poprečnim L4/L5 presjecima leđne moždine štakora. Rezultati pokazuju kako, sukladno očekivanjima, karagenan dovodi do bilateralne aktivacije neurona u leđnoj moždini dok unilateralna primjena BT-A smanjuje istu na obje strane leđne moždine. Pritom je statistički značajno smanjenje ekspresije c-Fosa zabilježeno u odnosu na kontrolnu skupinu i na skupinu tretiranu s anti-BT-A na ipsilateralnoj, ali i na kontralateralnoj strani leđne moždine. Ovo je još jedan u nizu dokaza o središnjem mjestu antinociceptivnog djelovanja BT-A, pri čemu se ne može isključiti mogućí transinaptički prijenos BT-A u druge neurone/stanice uključene u proces nocicepcije na razini leđne moždine.

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

Rad sadrži: 57 stranica, 11 grafičkih prikaza, 4 tablice i 36 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: botulinum toksin tipa A, dorzalni rog, c-Fos, bol, karagenanski model upalne boli, imunohistokemija

Mentor: **Prof. dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Prof. dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Doc. dr. sc. Toma Keser**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr.sc. Višnja Drinovac Vlah**, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2022.

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

Valentina Meglič

### SUMMARY

Botulinum toxin type A (BTX-A) has been used to treat numerous clinical conditions characterised by muscle spasticity for years. Long-term antinociceptive effect of BTX-A after its single peripheal application has been reported in various experimental models of inflammatory and neuropathic pain. This, combined with its low side effects frequency differs BT-A from other currently used systemic painkillers. Until now, many preclinical and clinical studies have been conducted with the goal of discovering BT-A's exact mechanism and site of action in mind, which would allow for the expansion of current indications to many other pain conditions. In contrast to generally accepted theory of BTX-A's peripheral suppression of neurotransmitters release from sensory nerve endings, the results of several recent researches suggest its central site of action, most likely at the dorsal horn of spinal cord level, where peripherally applied BTX-A is delivered by retrograde axonal transport. There is also evidence that BTX-A has bilateral antinociceptive effect after its unilateral peripheral application. The goal of this master's thesis was to confirm these statements using inflammatory pain model where pain is inflicted by carrageenan injection into hindpaws of male Wistar rats. One group of animals was pretreated with a BTX-A dose of 7 i.u./kg, while another group was treated with BTX-A antitoxin (anti-BTX-A) alongside BTX-A. Control groups have received saline injection (0,9 % NaCl) instead of BTX-A and one of them was treated with saline instead of carrageenan in an attempt to avoid inflammation. Expression of c-Fos (neuronal activity marker), which was used as indirect pain indicator, was imunohistochemically examined in L4/L5 cross sections of rat spinal cord. The results show that, in line with our expectations, carrageenan is enabling bilateral activation of spinal neurons while BTX-A reduced this activation on both sides of the spinal cord. Statistically significant reduction of c-Fos expression was recorded in comparison with control group and with experimental group treated with anti-BTX-A on both the ipsilateral and contralateral side of spinal cord. This is just another proof that BTX-A is exerting its antinociceptive effects centrally, with both sides of spinal cord as its site of action.

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

Thesis includes: 57 pages, 11 figures, 4 tables and 36 references. Original is in Croatian language.

Keywords: botulinum toxin type A, dorsal horn, c-Fos, pain, carrageenan inflammatory pain model, immunohistochemistry

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

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

**Toma Keser, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

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

The thesis was accepted: July 2022.