

# Pocijepani SNAP-25 kao marker središnjeg mjesta djelovanja botulinum toksina tipa A na bol

---

Ipša, Anna

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:163:059929>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-29**



Repository / Repozitorij:

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



**Anna Ipša**

**Pocijepani SNAP-25 kao marker središnjeg  
mjesto djelovanja botulinum toksina tipa A na  
bol**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.



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

*Na početku se želim zahvaliti svojoj obitelji koja je kroz ovih pet godina bila neiscrpan izvor podrške, motivacije, ali najvažnije od svega, ljubavi. Najviše se želim zahvaliti mami i tati koji su uvijek znali dati najbolji savjet i saslušati sve moje probleme. Hvala vam što ste mi bili nit vodilja.*

*Želim se zahvaliti svim svojim prijateljima koji su mi obogatili i oblikovali studentski život. Najviše se ipak želim zahvaliti svojim prijateljicama koje su me učinile boljom i sretnijom osobom tijekom ovih pet godina. Hvala vam što ste uvijek bile tu za mene i hvala vam što me i dalje volite nakon svakog mog „sve će biti uredu“.*

*Posebno se zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Lidiji Bach-Rojecky za svu pomoć tijekom izrade diplomskog rada. Vidjevši Vašu ljubav prema farmakologiji, nanovo sam se zaljubila u našu predivnu struku. Također, veliko hvala asistentici mag. pharm. Daliji Vađunec na pomoći, savjetima i druženju tijekom izrade ovoga rada.*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. BOTULINUM TOKSIN TIP A .....	1
1.2. BOL .....	2
1.2.1. NEUROTRANSMITORI I BOL .....	4
1.2.2. PUTOVI BOLI.....	5
1.2.3. BOTULINUM TOKSIN TIPA A I BOL.....	6
1.3. SNAP-25.....	8
1.4. MODELI UPALE I BOLI .....	10
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME .....</b>	<b>13</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>14</b>
3.1. ŽIVOTINJE I TKIVO .....	14
3.2. BOTULINUM TOKSIN TIPA A (BT-A).....	14
3.2.1. ANTITOKSIN ZA BOTULINUM TOKSIN TIPA A (ANTI-BT-A).....	15
3.3. KORIŠTENE KEMIKALIJE, REAGENSI I PROTUTIJELA .....	15
3.4. EKSPERIMENTALNI PROTOKOL – PRIPREMA TKIVA ZA IMUNOHISTOKEMIJSKU ANALIZU 15	
3.4.1. IMUNOHISTOKEMIJA .....	16
3.5. STATISTIČKA ANALIZA .....	17
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>18</b>
4.1. GRAĐA LEĐNE MOŽDINE.....	18
4.1.1. LUMBALNI SEGMENT .....	19
4.1.2. DORZALNI ROG.....	19
4.2. IMUNOREAKTIVNOST POCIJEPANOGA SNAP-25 NAKON I.PL. PRIMJENE BT-A .....	21
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>25</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>27</b>
<b>7. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA .....</b>	<b>28</b>
<b>8. LITERATURA .....</b>	<b>30</b>
<b>9. SAŽETAK.....</b>	<b>35</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>36</b>

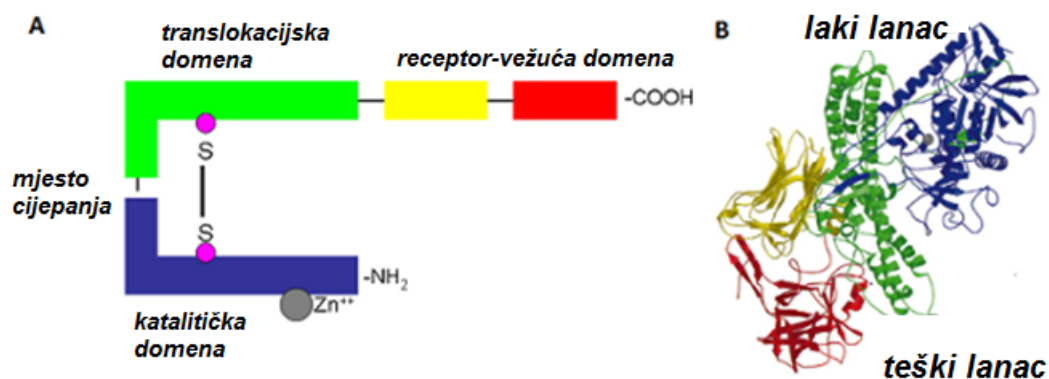
# 1. UVOD

Justinus Kerner (1786–1862), njemački liječnik i pjesnik, opisao je kliničke simptome izbijanja smrtonosnog trovanja hranom u Stuttgartu, koje su karakterizirali gastrointestinalni problemi, diplopija (dvoslika) i midrijaza (povećanje zjenica). Bolest, koja se počela nazivati botulizmom po *botulusu*, latinskoj riječi za kobasicu, ispravno se pripisivala konzumaciji djelomično kuhanih krvavica. Krajem 19. stoljeća, Émile Pierre-Marie van Ermengem, belgijski bakteriolog, povezo je botulizam s toksinom koji proizvodi *Clostridium botulinum*, anaerobna bakterija (Lim i Seet, 2007). *Clostridium botulinum* je gram pozitivna sporogena bakterija koja je ujedno i obvezni anaerob čije je prirodno stanište tlo, iz kojeg se može izolirati bez poteškoća (Arnon i sur., 2001). U anaerobnim uvjetima prelazi u vegetativni oblik, u čijem se citosolu stvara sedam različitih serotipa neurotoksina: tip A, B, C1, D, E, F i G (Bach-Rojecky, 2006). Serotip H nedavno je pronađen te je u fazi karakterizacije (Barash i Arnon, 2014). Ovi toksini djeluju specifično na perifernim kolinergičnim živčanim završecima, gdje priječe egzocitozu acetilkolina iz presinaptičkog neurona. Trovanje botulinum neurotoksinima uzrokuje botulizam, pri čemu se procjenjuje da je letalna količina kristaliničnog botulinum toksina tipa A (BT-A) oko 70 µg kod peroralnog unošenja, 0,09-0,15 µg uslijed intravenske i intramuskularne primjene, odnosno 0,70-0,90 µg ako se inhalira, što ga čini najpotentnijim otrovom u prirodi te iz navedenih razloga predstavlja prijetnju kao potencijalno bojno oružje (Bach-Rojecky, 2006).

## 1.1. Botulinum toksin tip A

*C. botulinum* sintetizira BT-A kao kompleks od 900 kDa. Najveći dio tog molekularnog kompleksa čine netoksični hemaglutinini i drugi proteini. Oni su fiziološki neaktivni, a smatra se da štite biološki aktivni dio molekule od proteolize i denaturacije pri visokoj temperaturi ili kiselom pH, odnosno prilikom prolaska kroz probavni sustav i u izvanstanični prostor (Gu i Jin, 2013). Biološki aktivni dio molekule oblikuju dva lanca povezana disulfidnom vezom, a čini ga 1296 aminokiselina. Dugi (teški) lanac, veličine oko 100 kDa, odgovoran je za vezanje neurotoksina za presinaptičke membrane, dok kratki (laki) lanac (50 kDa) posjeduje endopeptidaznu aktivnost i specifično cijepa ključne proteine u procesu vezanja sinaptičkih mjehurića s membranom (Bach-Rojecky, 2006). Veći, teži lanac podijeljen je u dvije funkcionalno različite regije: receptor-vežuću domenu (na karboksilnom kraju) te

translokacijsku domenu (na amino kraju) (Slika 1). Pomoću receptor-vežuće domene veže se na akceptorske molekule na živčanom završetku - poligangliozide, SV2 proteine (engl. *Synaptic Vesicle Protein 2*) i receptor za faktor rasta fibroblasta 3 nakon čega slijedi endocitoza. Zakiseljavanjem unutrašnjosti endosoma dolazi do translokacije, odnosno oslobađanja lakog lanca u citosol nakon hidrolize disulfidne veze. Laki lanac je cinkova metaloproteaza koja, ovisno o serotipu, cijepa jedan ili više proteina ključnih u procesu egzocitoze neurotransmitora (Harper i sur., 2011). SNARE proteini (engl. *Soluble N-ethylmaleimid-sensitive factor attachment protein receptor*) zajedničko je ime za proteine: SNAP-25 (engl. *synaptosomal associated protein of 25 kDa*), sinaptobrevin ili VAMP (engl. *vesicle-associated membrane protein*) i sintaksin. SNARE proteini uključeni su u fuziju membrane sinaptičkog mjehurića i presinaptičke membrane neurona. Time cijepanje SNARE proteina pomoću lakog lanca rezultira inhibicijom oslobađanja acetilkolina (ACh) na neuromuskularnom spoju, što dovodi do inhibicije neurotransmisije i acetilkolinom-posredovane kontrakcije mišića (Turton i sur., 2002). Inhibicija lučenja acetilkolina na živčano-mišićnoj spojnici i u autonomnim sinapsama rezultira mišićnom paralizom, suhoćom usta, zamagljenim vidom i drugim tipičnim antikolinergičkim simptomima botulizma (Sobel, 2005).



Slika 1. Građa BT-A (preuzeto i prilagođeno prema Lebeda i sur., (2008))

## 1.2. Bol

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

Bol najčešće upozorava organizam od mogućih ozljeda te ne slabi, za razliku od ostalih somatosenzornih modaliteta koji se adaptiraju i slabe usred ponavljanja podražaja. Bol se može kategorizirati prema porijeklu (kutana, mišićna, viscerlna i dr.), etiologiji ili patofiziologiji, intenzitetu, simptomima te prema trajanju. Tako se prema etiologiji razlikuje nociceptivna, upalna te neuropatska bol. Nociceptivna bol javlja se kod bolnih podražaja (mehanički, kemijski, toplinski) koji upozoravaju tijelo na moguću ozljedu tkiva. Bol traje nekoliko sekundi te je akutne prirode. Upalna bol odgovor je na ozljedu tkiva i popratni upalni proces. Usljed upale se iz stanica oko nociceptora (na primjer, trombocita te mastocita) luče različiti medijatori upale poput kinina, serotoninina, eikosanoida, citokina i dr. Sukladno tome, sama aktivacija nociceptora dolazi izravno od bolnog podražaja ili upalnih medijatora na mjestu ozljede. Bol može trajati satima do danima. Neke od glavnih karakteristika te vrste boli su primarna i sekundarna hiperalgezija te alodinija (Bach-Rojecky, 2006). Hiperlgezija se odnosi na povećanu osjetljivost na bolne podražaje, dok alodinija na povećanu osjetljivost na podražaje koji nisu bolni (poput dodira) (Koltzenburg i sur., 1999). Neuropatska bol nastaje kao posljedica ozljede ili disfunkcije perifernog živčanog sustava i/ili središnjeg živčanog sustava (SŽS-a) u stanjima kao što su, primjerice dijabetes, kronični alkoholizam, HIV-infekcija, a može biti uzrokovana i lijekovima, poput citostatika taksana i vinka alkaloida, nekih antivirusa, i sl. Patofiziologija ove vrste boli je vrlo složena, s kompleksnim perifernim i središnjim mehanizmima koji dovode do periferne i središnje senzitivacije. Bol traje mjesecima do godinama. Neke od glavnih karakteristika ove vrste boli su također primarna i sekundarna hiperalgezija i alodinija, ali i spontana bol i parestezije (Harden, 2005). Parestezija označava spontano javljanje osjetnih doživljaja bez odgovarajućih popratnih vanjskih ili unutarnjih podražaja poput trnaca, iglica, bockanja, žarenja ili pečenja ([www.enciklopedija.hr](http://www.enciklopedija.hr)). Kod liječenja boli koriste se razne skupine lijekova, ali najučestaliji su svakako nesteroidni anti-inflamatorni lijekovi (NSAIL). Njihov mehanizam djelovanja je inhibicija enzima ciklooksigenaze što za posljedicu ima smanjenje sinteze prostaglandina, medijatora upale i boli. Nadalje, za liječenje boli se mogu koristiti i opioidni agonisti koji zbog svog djelovanja u mozgu pojačavaju silaznu inhibiciju kontrole prijenosa bolnog impulsa u kralješničkoj moždini, dok u dorzalnom rogu kralješničke moždine smanjuju lučenje ekscitacijskih neurotransmitora i podražljivost sekundarnog neurona. No, kada je riječ o kroničnoj boli, gore navedene opcije nisu učinkovite pa se poseže za dodatnim terapijskim opcijama poput lokalnih anestetika, nekih antiepileptika, antidepresiva. U fazi istraživanja su i lijekovi s drugačijim mehanizmima djelovanja, poput agonista vaniloidnog receptora (TRPV1, engl. *Transient receptor potential cation channel, subfamily vanilloid receptor*), antagonista purinergičnih,

serotoninergičnih 5-HT<sub>3</sub> i glutamatnih NMDA (N-Metil-D-Aspartat) receptora, ali i tvari poput kanabinoida (Bach-Rojecky, 2006). Glavni nedostatak gore navedenih lijekova jest što svi djeluju kratkotrajno, zbog čega liječenje kronične boli zahtijeva njihovu dugotrajnu i učestalu primjenu, a ona je često povezana s neugodnim nuspojavama. Botulinum toksin tipa A (BT-A) je za sada jedini lijek koji u različitim eksperimentalnim i kliničkim istraživanjima ima dugotrajni učinak nakon jednokratne primjene (Jabbari i Machado, 2011).

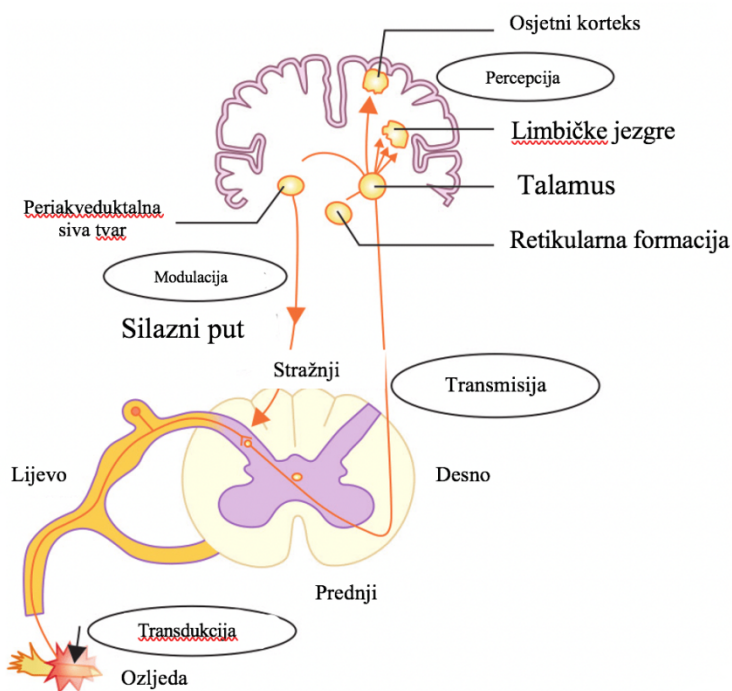
### **1.2.1. Neurotransmitori i bol**

Neurotransmitori mogu biti ekscitacijskog i inhibicijskog karaktera, ovisno o učinku koji ostvaruju preko specifičnih proteinskih makromolekula na staničnoj membrani (receptora). Prema kemijskoj strukturi razlikuje se nekoliko podskupina, a najviše istraživani su monoamini (noradrenalin, serotonin, dopamin), kao i amiokiseline (glutamat, aspartat, gama-aminomaslačna kiselina – GABA), te neuropeptidi (supstancija P- SP, peptid povezan s kalcitoninskim genom - CGRP), i drugi (Smolec i sur., 2021).

Glutamat je glavni ekscitacijski neurotransmitor u svim neuronima u osjetnom putu. Djeluje preko ionotropnih AMPA (AMPA -  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kiselina) i NMDA (NMDA - N-metil-D-aspartat) receptora na perifernim završecima aferentnih živaca, neuronima dorzalnog roga kralješnične moždine i neuronima u talamusu. Pri upali se periferno, osim glutamata, oslobađaju i neuropeptidi SP i CGRP koji imaju važne autokrine i parakrine učinke. U samoj transmisiji bolnih impulsa u kralješničkoj moždini osim glutamata učinke imaju SP i drugi tahikinini, CGRP, somatostatin, faktor lučenja kortikotropina (CRF), kolekistokinin, galanin te vazoaktivni intestinalni peptid (VIP). Oni se oslobađaju iz središnjih završetka aferentnog senzornog vlakna. Međutim, i mnogi drugi medijatori iz ne-živčanih izvora (pr. iz glija stanica) u dorzalnog roga kralješničke moždine, poput adenozin tri-fosfata (ATP-a), dušik-2-oksida (NO), prostaglandina i različitih neurotropina, mogu djelovati sinergistički povećavajući transmisiju ili mogu djelovati inhibicijski, tj. smanjiti transmisiju bolnih impulsa. U kralješničkoj moždini mogu se pronaći ekscitacijski i inhibicijski interneuroni, pri čemu su posebno važni inhibicijski opioidni i GABA interneuroni koji ulaze u sinaptičke kontakte i s postsinaptičkim neuronima drugog reda, kao i s presinaptičkim završetkom primarnog aferentnog neurona (Bach-Rojecky, 2006).

## 1.2.2. Putovi boli

Put boli počinje na periferiji na slobodnim živčanim završecima primarnih aferentnih neurona (nociceptori) čiji periferni terminalni aksoni reagiraju na različite vrste podražaja (mehaničke, kemijske, toplinu i hladnoću) i dolazi do transdukcije. Primarna aferentna vlakna klasificiraju se na temelju njihove brzine provođenja i podražaja koji rezultira njihovom aktivacijom. A-beta ( $A\beta$ ) vlakna su mijelinizirana vlakna velikog promjera koja imaju veliku brzinu vođenja ( $>20$  m/s) a nakon aktivacije proizvode osjećaj laganog dodira, pritiska ili pokreta kose. A-delta ( $A\delta$ ) vlakna su tanka mijelinizirana vlakna koja provode brzinom od 2 do 20 m/s. C vlakna su prevladavajuća aferentna vlakna u perifernim živcima. To su nemijelinizirana vlakna koja provode brzinom manjom od 2 m/s. I  $A\delta$  i C vlakna mogu reagirati na intenzivnu toplinu, hladnoću te mehaničke i kemijske podražaje. Aktivacijom  $A\delta$  vlakna dolazi do nastanka intenzivnog, oštrog osjećaja probadajuće boli, dok aktivacija C vlakana rezultira tupim dugotrajnim osjećajem pečenja. Budući da  $A\delta$  vlakna provode većom brzinom od C vlakana, vjeruje se da ta vlakna prenose osjećaj "prve boli", dok C vlakna izazivaju osjećaj trajnije "druge boli". Oba vlakna nalaze se u koži i drugim površinskim organima, dok su C vlakna glavni opskrbljivači dubokih struktura poput mišića i zglobova. Ti se senzorni neuroni zatim tvore sinapse s neuronima drugoga reda i to u dorzalnog rogu leđne moždine u područjima zvanim *laminae*. Neuroni drugog reda zatim nastavljaju prenositi signal u talamus preko spinothalamičnog i spinoretikularnog trakta (Slika 2). Talamus obrađuje somatosenzorne informacije, a neuroni unutar talamusa projektiraju u različite regije mozga uključujući primarni i sekundarni somatosenzorni korteks, insulu, prednji cingularni korteks i prefrontalni korteks. Korteks je mjesto gdje je percepcija boli (intenzitet, trajanje, mjesto) integrirana (Lee i Neumeister, 2020).



**Slika 2.** Nociceptivni put (preuzeto i prilagođeno prema Sharma i Das (2018))

### 1.2.3. Botulinum toksin tipa A i bol

Botulinum toksin tipa A pokazuje potencijal u kliničkoj praksi koji kontinuirano raste. Već više od 30 godina pročišćeni BT-A koristi se u nanomolarnim dozama u liječenju različitih kliničkih stanja praćenih povećanom kontraktilnošću mišića. Otkriće mehanizma kojim BT-A uzrokuje trovanje, odnosno botulizam, omogućilo je terapijsku primjenu BT-A te mogućnost lokalne primjene malih doza u zahvaćeni mišić, gdje s velikom selektivnošću ulazi u završetke motoneurona. Nadalje, pokazano je da BT-A djeluje i na parasimpatičke neurone, što je proširilo primjenu BT-A na liječenje autonomnih poremećaja (Matak i Lacković, 2014). Američka Agencije za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) 1989. godine, nakon rezultata kliničkih opažanja i istraživanja, odobrila je primjenu niskih doza BT-A u liječenju strabizma, pa potom i blefarospazma. Godine 2000. FDA je proširila primjenu BT-A na cervikalnu distoniju, te dječju cerebralnu paralizu i spasticitet mišića različite etiologije. Također, iste godine odobrena je i primjena toksina u kozmetičke



svrhe za tretiranje bora, čime je botulinum toksin postao poznat i najširoj javnosti. Danas je primjena BT-A odobrena i kod poremećaja autonomnog živčanog sustava, i to kod primarne aksilarne hiperhidroze (Janković, 2004).

Registrirana su tri pripravka BT-A na tržištu EU i SAD-a:

- Botox®, Botox Cosmetic® (Allergan, SAD): onabotulinumtoxin A (kao kompleks veličine 900 kDa)
- Dysport® (Ipsen, Francuska): abobotulinumtoxin A (kao kompleks veličine 900 kDa)
- Xeomin® (Merz, Njemačka): incobotulinumtoxin A (150 kDa biološki aktivni dio kompleksa) (Drinovac-Vlah, 2017).

Povoljno djelovanje BT-A na bol najprije je uočeno u bolesnika s cervikalnom distonijom (Tsui i sur., 1986.) Izvorno se pretpostavljalo da je mehanizam kojim BT-A smanjuje bol posljedica opuštanja mišića. To se temeljilo na onome što je bilo poznato o farmakološkom djelovanju BT-A, posebno inhibiciji acetilkolinom posredovanog učinka na neuromišićnoj ploči. Međutim, ustanovilo se da analgetsko djelovanje nastupa prije i da traje dulje od miorelaksirajućeg djelovanja (Freund i Schwartz, 2003). Dodatno, pokazalo se da BT-A može smanjiti i bol koja nije praćena povećanom mišićnom kontrakcijom, poput tenzijske glavobolje i neuropatske boli (Argoff, 2002), a to je konačno 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 (Drinovac-Vlah, 2017). Sukladno tome, daljnja istraživanja *in vitro* i *in vivo* ponudila su nove moguće mehanizme djelovanja BT-A, neovisno od dobro poznatog djelovanja na neuromuskularnoj ploči (Aoki i Guyer, 2001). Istraživanje Welcha i suradnika (2000.) dovelo do saznanja da BT-A u *in vitro* uvjetima inhibira oslobađanje SP iz neurona ganglija dorzalnog roga, a daljnji, eksperimenti *in vitro* pokazali su da BT-A također sprječava oslobađanje serotonina, dopamina, noradrenalina, glutamata, GABA, enkefalina, glicina, SP, ATP-a i CGRP-a, pri čemu je jači inhibitorni učinak pokazan u oslobađanju ekscitatornih neurotransmitora poput acetilkolina i glutamata, za razliku od GABA-e (inhibitorni neurotransmitor). To se objašnjava time što je SNAP-25 (glavna meta djelovanja BT-A) negativan regulator kalcijevih kanala, pa time više razine SNAP-25 u ekscitatornim neuronima čini te neurone osjetljivijima na BT-A u usporedbi s inhibitornim neuronima (Matak i Lacković, 2014).

Nadalje, istraživanjima na animalnim modelima se pokazalo da se perifernom primjenom BT-A u štakora uklanja upalna bol u formalinskom testu, ali i u eksperimentalnim modelima

upalne boli uzrokovane karagenanom, odnosno kapsaicinom. Sam učinak BT-A nakon periferne primjene nastupa nakon 5 dana, a traje 30 dana (formalinski test). Posebnost BT-A je da ne djeluje na akutnu nociceptivnu bol, odnosno ne mijenja pragove podražljivosti neurona (za razliku od primjerice opioida). Također, zanimljivo saznanje je da BT-A ne pokazuje učinak na lokalnu upalu (edem uzrokovan karagenanom ili ekstravazaciju plazme uzrokovanu kapsaicinom), već samo djeluje na bol kao posljedicu upale. Nadalje, pokazalo se da pored upalne, uklanja i eksperimentalnu neuropatsku bol uzrokovanu parcijalnom transekcijom *nervusa ishiadicusa*, a također se ustanovilo i da djeluje na hiperalgeziju u eksperimentalnoj dijabetičkoj neuropatiji (Bach-Rojecky, 2006).

Valja nadodati da su Drinovac i sur. (2016.) dokazali kako jednostrano primijenjen BT-A ima bilateralni učinak u eksperimentalnom modelu „zrcalne boli“. Bol u zrcalnoj slici ili „zrcalna bol“ je bol koja se javlja suprotno od strane ozljede. BT-A je jedina dosad poznata tvar s bilateralnim učinkom u različitim tipovima eksperimentalnih „zrcalnih boli“ nakon jednostrane lokalne primjene. Bilateralna analgezija nakon jednostrane primjene pokazana je i u modelu dijabetičke neuropatije, kao i na modelu zrcalne boli uzrokovane intramuskularnom primjenom fiziološke otopine pH 4,0 (Drinovac Vlah i Bach-Rojecky, 2020). U svim spomenutim modelima BT-A je primijenjen periferno, odnosno u plantarnu stranu stažnje šape štakora, a dodatno su rađeni pokusi i nakon primjene u spinalni kanal (intratekalna primjena) te u *cisternu magnu* (intracisternalna primjena). BT-A je u različitim modelima pokazao učinak nakon periferne i intratekalne primjene, za razliku od intracisternalne primjene koja nije pokazala učinak. Time je pretpostavljeno da BT-A djeluje na bol segmentalno, odnosno na razini kralješničke moždine, a u djelovanje su moguće uključeni opioidni i GABA sustav (Drinovac i sur., 2016).

### **1.3. SNAP-25**

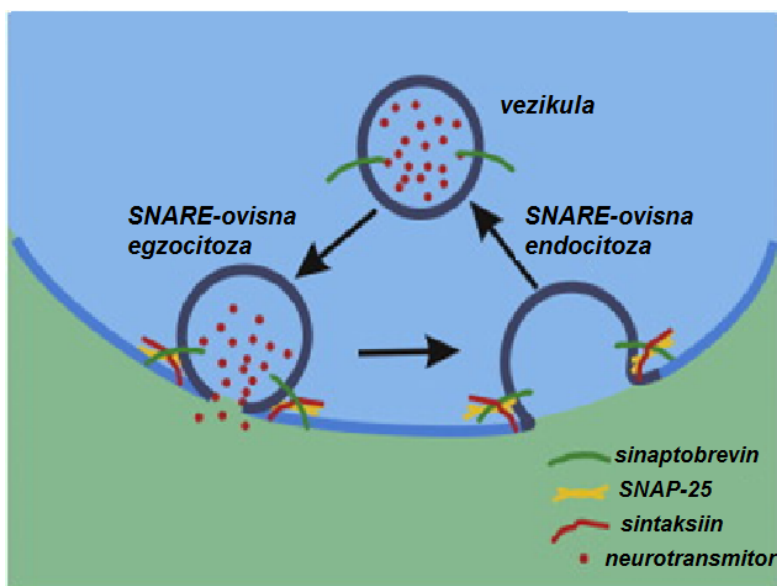
SNARE-kompleksi posreduju fuziju membranskih vezikula s njihovim ciljnim membranama, primjerice fuziju sekretorne vezikule s plazma membranom, fuziju endosoma jedan s drugim. Obitelj SNARE proteina sastoji se od 20 konzerviranih skupina proteina. Najbolje proučavan SNARE-kompleks je onaj koji se formira između tri proteina, VAMP2 (engl. *vesicle-associated membrane protein*)/sinaptobrevin-2, sintaksin-1 i SNAP-25, koji posreduju brzu egzocitozu u neuronima. Struktura ovog kompleksa je zavojnica sa četiri spirale, koju tvore po jedan  $\alpha$ -heliks od VAMP2 i sintaksina-1, te dva od SNAP-25. Namotana zavojnica djelomično se drži zajedno slojevima hidrofobnih interakcija u svom središtu. Multi

sloj, koji se nalazi u sredini kompleksa, sastoji se od jednog ostatka arginina (koji potječe iz VAMP2) i tri ostatka glutamina iz tri druga SNARE-motiva (Kádková i sur., 2019).

SNAP-25 je hidrofilni protein od 206 aminokiselina. Povezuje se s membranama preko palmitilnih ostataka koji su tioesterski povezani s četiri usko raspoređena cisteinska ostatka u središtu proteina. Amino- i karboksi-terminalne domene su visoko konzervirane. Gen *SNAP-25* sadrži 8 egzona. Alternativno prekrajanje dviju varijanti egzona 5 objašnjava postojanje dvije izoforme (SNAP-25a i b) koji se razlikuju u sekvenci od devet aminokiselina koja sadrži četiri središnja cisteinska ostatka. Proteoliza botulinum neurotoksinima A, E i C1 (BT-/A, E, C1) skraćuje SNAP-25 cijepanjem jedne peptidne veze blizu karboksi kraja. BT-A i E cijepaju jedino SNAP-25, dok BT-C1 također cijepa i sintaksin. Syndet i SNAP-23 su homolozi SNAP-25 s homologijom sekvence od približno 60 %. Njihove amino-terminalne spiralne domene koje tvore zavojnicu su kraće i smatra se da posreduju u konstitutivnoj egzocitozi interakcijom s izoformama sintaksina i sinaptobrevina na plazma membrani (Hodel, 1998).

Kako su svi SNARE-kompleksi do sada proučavani u skladu s ovom strukturom (VAMP2/sinaptobrevin-2, sintaksin-1 i SNAP-25), SNARE-proteini se mogu kategorizirati kao Qa, Qb, Qc ili R, ovisno o njihovom položaju u SNARE-kompleksu i doprinosu nultom sloju. Većina SNARE-kompleksa sastoji se od četiri proteina, od kojih svaki dodaje jedan SNARE-motiv kompleksu. Međutim, u neuronskom SNARE-kompleksu, SNAP-25 pridonosi s dva SNARE-motiva, Qb (koji se naziva SN1 unutar SNAP-25) i Qc (nazvan SN2), koji su odvojeni poveznikom regijom. Pod-obitelj proteina SNAP-25 se kod kralježnjaka sastoji od SNAP-25, SNAP-23, SNAP-29 i SNAP-47, a uglavnom su lokalizirani na različitim dijelovima sekretornog puta nakon Golgija (Kádková i sur., 2019).

SNAP-25 tvori stabilan ternarni kompleks sa sintaksinom i sinaptobrevinom, dva proteina koja su bitna za  $Ca^{2+}$  reguliranu egzocitozu. Sinaptobrevin se nalazi na vezikulama dok se sintaksin kolokalizira sa SNAP-25. Citosolna ATPaza NSF (fuzijski protein osjetljiv na N-etilmaleimid) i a-SNAP (topivi NSF pričvrtni protein) kataliziraju rastavljanje kompleksa SNAP-25±sintaksin±sinaptobrevin (ili SNARE kompleksa za SNAP receptorski kompleks) *in vitro* tako što induciraju konformacijske promjene u sintaksinu (Hodel, 1998). Smatra se da se slična ATP-ovisna reakcija događa i *in vivo*. Pokazalo se da se SNAP-25, sam ili u kombinaciji sa sintaksinom, veže na  $Ca^{2+}$  kanale te ih negativno modulira što dovodi vezikule u neposrednu blizinu izvora  $Ca^{2+}$ . To je preduvjet za brzu kinetiku oslobađanja neurotransmitora, i može ograničiti prostorno širenje  $Ca^{2+}$  potaknutih signala (Hodel, 1998). Endocitoza vezikula reciklira vezikule i tako održava egzocitozu u sekretornim stanicama (Slika 3.) (Xu i sur., 2013).



**Slika 3.** SNARE proteini i egzo/endocitoza (preuzeto i prilagođeno prema Xu i sur., (2013))

SNARE proteini posreduju privlačenje i spajanje membrane vezikule s membranom neurona te stvaranje pore i egzocitozu, a sudjeluju i u procesu endocitoze

## 1.4. Modeli upale i boli

Kako bi se moglo istraživati bol, bilo je potrebno razviti odgovarajuće modele akutne i kronične boli koji bi bili jednostavni, reproducibilni, validirani i minimalno invazivni. Tako je 1990-ih došlo do intenzivnog razvoja različitih životinjskih modela za proučavanje učinaka različitih vrsta ozljede tkiva na razvoj akutne, ali i trajne ili kronične boli (Tablica 1). U većini ovih studija životinjama je bol izazvana (inducirana) primjenom različitih tvari s proupalnim i proalgetskim djelovanjem, ozljedom određenih perifernih živaca ili same kralješničke moždine. Budući da su životinje izložene određenom intenzitetu boli i patnje tijekom određenog razdoblja, posebna pozornost istraživača mora biti usmjerena na dobrobit životinja, kako bi se poduzele sve mjere da se patnja životinja svede na najmanju moguću mjeru (Ren i sur., 1999). Međutim, nemoguće je zamisliti istraživanja mehanizama boli i razvoja novih analgetika bez animalnih modela, usprkos njihovim nedostacima. Razumijevanje boli,

posebice one kroničnog trajanja predstavlja kontinuirani izazov za znanstvenike, ali i kliničare budući da velik broj svjetske populacije trpi kronične boli koje nisu odgovarajuće liječene.

Ne postoji jedan “najbolji organizam” za proučavanje boli, već svaki organizam ima svoje prednosti i nedostatke. Najčešće korišteni organizmi koji se koriste u eksperimentima su glodavci, a koriste se i ribice zebrice (*Danio rerio*), vinske mušice (*Drosophila sp.*) i nematode (*Caenorhabditis elegans*). Kod glodavca, uslijed složenosti različitih obrazaca ponašanja, omogućuje se vrlo važna analiza i afektivnih komponenti boli. S druge strane, jednostavniji organizmi, kao što je *Drosophila*, mogu olakšati otkrivanje novih molekularnih meta uključenih u posredovanje učinaka štetnih podražaja (Burma i sur., 2017).

**Tablica 1.** Prikaz odabranih eksperimentalnih modela boli (Burma i sur., 2017)

Vrsta boli	Modeli/ način izazivanja boli
Neuropatska bol	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Oštećenje perifernog živca uzrokovano kroničnim podvezivanjem ishiadicusa (engl. <i>chronic constriction injury</i>), zatim parcijalnim presijecanjem ishiadicusa (engl. <i>partial nerve transection</i>), i dr.</li> </ul>
Upalna bol	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Apliciranjem kemijskih iritansa, kao što su CFA (<i>engl. Complete Freund's adjuvant</i>), karagenan i formalin</li> </ul>
Postoperativna bol	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Akutnim rezom na plantarnoj površini šape, repu ili <i>gastrocnemius</i> mišića</li> </ul>
Modeli reumatoidnog artritisa (RA) (bol)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Injekcijama kolagena u bazu repa</li> <li>• transgenične životinje koje spontano razviju bol nalik RA</li> </ul>
Bol nalik osteoartritisu	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kemijski injiciranjem mononatrijevog jodoacetata u intraartikularni prostor koljenskog zgloba</li> <li>• Mehanički, kirurškom transekcijom ACL (puknuće ili istegnuće prednjeg križnog ligamenta)</li> <li>• Puknućem medijalnog meniskusa koljena</li> </ul>
Bol u području glave	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kranijalna vazodilatacija (pr. izazvana nitroglicerinom)</li> <li>• Električna stimulacija trigeminalnog ganglija</li> <li>• Kroničnim podvezivanjem infraorbitalnog živca</li> </ul>
Bol koja je rezultat patologija ili tretmana, uključujući bol uzrokovanu tumorom, bol u terapiji HIV-om, dijabetičku neuropatiju, bol uzrokovanu kemoterapijom i bol od multiple skleroze	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Oralna primjena ili sistemske injekcije farmakoloških sredstava (intraperitonealno injiciranje streptozotocina, paklitaksela, vinblastina, antiretrovirotika, oralna kronična primjena otopine alkohola...)</li> <li>• Korištenje transgeničnih životinja</li> </ul>
Sindromi visceralne boli	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kolorektalna distenzija</li> <li>• Intraperitonealna primjena octene kiseline</li> <li>• Cistitis i prostatitis uzrokovani lokalnom primjenom ciklofosfamida i kasaicina i dr.</li> </ul>

Karagenani ili karagenini su obitelj prirodnih linearnih sulfatiranih polisaharida koji se ekstrahiraju iz crvenih jestivih morskih algi (Yegappan i sur., 2018). Injekcija karagenana (1-3 %) u jastučić stopala proizvodi bol i hiperalgeziju (Ren i sur., 1999), a sam karagenan i jaku upalnu reakciju praćenu edemom (Bach-Rojecky, 2006). Termalna i mehanička hiperalgezija uzrokovana karagenanom ima najjači intenzitet 2-6 sati nakon injiciranja, da bi se tijekom sljedeća 24 sata smanjivala (Bach-Rojecky, 2006).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

U modernome svijetu gdje je bol sveprisutan problem, BT-A se pokazao kao molekula koja smanjuje kroničnu bolnu hiperosjetljivost nakon jednokratne primjene u trajanju od nekoliko mjeseci. Međutim, za sada je BT-A odobren jedino u preventivnoj terapiji kronične migrene. Iako se u početku vjerovalo da su antinociceptivni učinci BT-A posredovani njegovim djelovanjem na mišiće (na samoj neuromuskularnoj ploči), opažanja da BT-A također ublažava širok raspon bolnih stanja koja nisu povezana s mišićnom kontrakcijom, usmjerilo je daljnja istraživanja na njegove učinke na senzorne neurone. Brojnim pretkliničkim istraživanjima na animalnim modelima u posljednjih 20 godina predloženo je da BT-A interferira s procesima središnje senzitivacije nakon retrogradnog aksonalnog transporta u dorzalni rog kralješničke moždine s mjesta primjene. U dorzalnom rogu vjerojatno smanjuje lučenje ekscitacijskih neurotransmitora iz središnje grane primarnog aferentnog vlakna i prijenos boli u prvoj sinapsi nociceptivnog puta. Međutim, točan mehanizam djelovanja još uvijek nije razjašnjen (Matak i sur., 2019). Nekoliko je istraživanja indirektno dokazalo prisutnost BT-A u SŽS-u koristeći pocijepani SNAP-25 kao marker njegove proteolitičke aktivnosti.

Kako bi se utvrdilo mjesto djelovanja i razjasnilo pitanje transportnih putova BT-A, odnosno postoji li mogućnost transsinaptičkog transporta BT-A, u ovom se diplomskom radu imunohistokemijski pratila prisutnost pocijepanoga SNAP-25 proteina u dorzalnom rogu (L3-L6) leđne moždine nakon jednostrane periferne primjene BT-A u šapu štakora (intraplantarno, i.pl.), u modelu karagenanom-uzrokovane upalne boli.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Životinje i tkivo**

Za potrebe izrade ovog diplomskog rada analizirani su uzorci poprečnih prereza tkiva leđne moždine pokusnih životinja, odnosno mužjaka štakora soja Wistar starosti 5 mjeseca u težini od 400-500 g. Štakori su uzgojeni na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Za provođenje eksperimenta odabran je karagenanski model upalne boli, u kojem je 2 % otopina karagenana injicirana u obje stražnje šape štakora (intraplantarno), a nakon tri sata mjerena je osjetljivost na mehanički podražaj. Bihevioralna mjerenja nisu tema ovog diplomskog rada zbog čega u daljnjem tekstu neće biti opisani rezultati. Nakon bihevioralnih mjerenja, koje su provele osobe osposobljene za rad s pokusnim životinjama, životinje su anestetizirane, a tkivo (mozak, leđna moždina) je izvađeno na način prikladan za provođenje imunohistokemijaskih analiza i smrznuto na  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Tijekom izvođenja pokusa na laboratorijskim životinjama poštivao se Zakon o zaštiti životinja (NN 102/17) i i smjernice Međunarodne udruge za proučavanje boli (International Association for Study of Pain, IASP), a pokusi imaju dozvolu etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Zagrebu.

#### **3.2. Botulinum toksin tipa A (BT-A)**

U pokusu je korišten botulinum toksin tipa A (Botox<sup>®</sup>, Allergan, SAD). Za dobivanje potrebne doze, BT-A je otopljen u fiziološkoj otopini. Svaka bočica Botox<sup>®</sup> sadrži 100 i.j. (~4,8 ng) pročišćenog Clostridium botulinum toksina tipa A u obliku liofilizata. Jedna jedinica odgovara količini toksina koja nakon i.p. primjene uzrokuje smrt 50 % miševa ( $\text{LD}_{50} = 0,048 \text{ ng} = 1 \text{ i.j.}$ ). Sadržaj toksina u bočici je otopljen u fiziološkoj otopini tako da se dobije potrebna doza od 7 i.j./kg. BT-A je u ovom eksperimentu dvjema skupinama pokusnih životinja injiciran u stražnju desnu šapu (intraplantarno, i.pl.), u dozi od 7 i.j./kg i ukupnom volumenu od 20  $\mu\text{l}$  7 dana prije izvođenja bihevioralnog testiranja i prikupljanja uzoraka.



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

U pokusu je korišten antitoksin za botulinum toksin tipa A (Non-affinity purified equine IgG, National Institute for Biological Standards and Control, UK; dar Thea Sesardić) 100 i.j./100  $\mu$ L. Za dobivanje potrebne doze (2 i.j./10  $\mu$ L) anti-BT-A je pripremljen u fiziološkoj otopini. Anti-BT-A je u ovom eksperimentu jednoj skupini pokusnih životinja injiciran u leđnu moždinu na razini L5 (intratekalno, i.t.), u dozi od 2 i.j./10  $\mu$ L jedan dan nakon aplikacije BT-A, odnosno 6 dana prije izvođenja karagenanskog testa. Kontrolna skupina je umjesto anti-BT-A primila na jednaki način isti volumen konjskog seruma.

### **3.3. Korištene kemikalije, reagensi i protutijela**

Za provođenje imunohistokemijskih analiza korištene su sljedeće kemikalije i reagensi te aparatura:

#### **Kemikalije, reagensi i protutijela:**

Kalijev hidrogenfosfat, bezvodni (Gram-mol, Hrvatska)

Kalijev klorid (Gram-mol, Hrvatska)

Natrijev klorid (Gram-mol, Hrvatska)

Natrijev fosfat dvobazni bezvodni (CARLO ERBA Reagents, Francuska)

Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, SAD)

Fluoroshield (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, SAD)

Kozji serum (*eng. NGS, normal goat serum*), (Thermo Fisher Scientific, SAD)

Alexa Fluor™ 488 Tyramide SuperBoost™ Kit, goat anti-rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific, SAD).

### **3.4. Eksperimentalni protokol – priprema tkiva za imunohistokemijsku analizu**

Eksperiment se sastojao od 4 skupine životinja (8 životinja u skupini):

1.) Kontrolna skupina kojoj je 7 dana prije karagenanskog testa injicirana fiziološka otopina i.pl. u desnu šapu, odnosno 6 dana prije karagenanskog testa injiciran konjski serum i.t., a 7. dan injicirana je fiziološka otopina i.pl. u obje šape štakora.

2.) Eksperimentalna kontrolna skupina kojoj je 7 dana prije karagenanskog testa injicirana fiziološka otopina i.pl. u desnu šapu, odnosno 6 dana prije karagenanskog testa injiciran konjski serum i.t., a 7. dan injiciran je karagenan (2%) i.pl. u obje šape štakora.

3.) Eksperimentalna skupina I, kojoj je 7 dana prije karagenanskog testa injiciran BT-A i.pl. u desnu šapu, odnosno 6 dana prije karagenanskog testa injiciran konjski serum i.t., a 7. dan injiciran je karagenan (2%) i.pl. u obje šape štakora.

4.) Eksperimentalna skupina II, kojoj je 7 dana prije karagenanskog testa injiciran BT-A i.pl. u desnu šapu, odnosno 6 dana prije karagenanskog testa injiciran anti-BT-A i.t., a 7. dan injiciran je karagenan (2%) i.pl. u obje šape štakora.

Za potrebe imunohistokemijskih analiza u ovom diplomskom radu, korišteni su uzorci iz eksperimentalnih skupina 3 i 4, uz jedan kontrolni uzorak iz skupine 2 (eksperimentalna kontrola – negativna kontrola).

Tri sata nakon i.pl. karagenanske injekcije, štakori su duboko anestetizirani kombinacijom anestetika ketamin (70 mg/kg) + ksilazin (35 mg/kg) te podvrgnuti transkardijalnoj perfuziji s paraformaldehidom radi uzimanja tkiva mozga i leđne moždine za pripremu uzoraka potrebnih za imunohistokemijsku analizu.

### **3.4.1. Imunohistokemija**

Kao što je već navedeno prethodno u radu, uzorci mozga i leđne moždine čuvali su se na temperaturama od -80 °C. Smrznuti uzorci leđne moždine izrezani su na kriostatu (Leica, Germany) na poprečne prereze debljine 35 µm. Imunohistokemijska obrada uzoraka izrađena je sukladno s uputama u komercijalnom kitu (Alexa Fluor™ 488 Tyramide SuperBoost™ Kit). Cijeli proces trajao je dva dana.

Prvi dan su uzorci stavljeni u jažice te su ispirani 3 puta po 5 minuta u 0,25 % otopini PBS – TritonX100 (PBS-T). Zatim se dodao vodikov peroksid iz kita te se inkubiralo sat vremena na sobnoj temperaturi. Ponovno se ispralo 3 puta po 5 minuta u PBS-T puferu, nakon čega se dodao blok pufer iz kita (10 %-tni kozji serumom). Nakon inkubacije od sat vremena,

prerezima je dodano anti-clSNAP-25 primarno protutijelo (1:8000) u 1% kozjem serumu te je ostavljeno tijekom noći na sobnoj temperaturi. Sljedeći dan prerezi su isprani 3 puta po 5 minuta PBS-T puferom i inkubirani jedan sat na sobnoj temperaturi s polimeraznom peroksidazom iz hrena (*eng. poly-HRP, polymerized horseradish peroxidase*) i dodan je tiramid koji je prethodno pripremljen sukladno uputama u kitu. Nakon deset minutne inkubacije na sobnoj temperaturi, tiramidu je dodana STOP otopina koja je pripremljena s PBS puferom (1:11) kako bi se zaustavila reakcija. Uzorci su još 3 puta po 5 minuta bili isprani s PBS-T puferom i nakon toga stavljeni na predmetna stakalca. Prije stavljanja pokrovnog stakalca, na uzorke je stavljen medij za očuvanje fluorescencije *Fluoroshield*. Prerezi su vizualizirani fluorescentnim mikroskopom (Olympus BX51, Olympus, Tokyo, Japan) spojenim na digitalnu kameru (Olympus DP-70, Olympus, Tokyo, Japan) i fotografirani na 4x, 10x, 20x i 40x povećanjima.

Površina ekspresije produkta djelovanja BT-A, odnosno pocijepani SNAP-25 protein (cl-SNAP-25), mjerena je pomoću *Fiji Image J* programa u tri vidna polja na tri nasumična prereza L3, L4 i L5/6 segmenta leđne moždine životinja (n=5). Za pojedinu životinju, vrijednosti tri vidna polja pojedinog prereza su zbrojene, a iz vrijednosti tri prereza su potom dobivene srednje vrijednosti koje su se zbrojile po segmentima (L3 + L4 + L5/6).

### **3.5. Statistička analiza**

Rezultati pokusa izraženi su kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna pogreška aritmetičke sredine (SEM) i prikazani u obliku grafa sa stupcima. Razlika varijanci analizirana je dvosmjernom analizom (Two-way ANOVA) i Tukey post-hoc testom. Kao statistički značajna vrijednost uzeta je  $p < 0,05$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. Građa leđne moždine

Koristeći metodu imunohistokemije, provedena je kvalitativna analiza s ciljem detekcije prisutnosti pocijepanog SNAP-25 u segmentima leđne moždine nakon intraplantarne primjene BT-A. Pristupilo se analizi L3 do L6 (lumbalni) segmenta leđne moždine. Za kvalitetniju interpretaciju dobivenih rezultata nužno je razumjeti same anatomske karakteristike i posebnosti leđne moždine.

Leđna moždina je cjevasta struktura koja počinje na kraju moždanog debla i nastavlja se gotovo do dna kralježnice. Završava oko tri četvrtine puta niz kralježnicu, ali se snop živaca proteže izvan moždine. Taj se snop naziva *cauda equina* jer podsjeća na konjski rep. *Cauda equina* prenosi živčane impulse, motoričke i osjetne, do i od nogu (<https://www.merckmanuals.com/home>). Duljina leđne moždine je oko 45 cm u muškaraca i 43 cm u žena, a širina joj se kreće od 1,27 cm u vratnom i lumbalnom dijelu do 64 mm u torakalnoj regiji. Leđna moždina ima 31 segment (8 cervikalnih, 12 torakalnih ili dorzalnih, 5 lumbalnih, 5 sakralnih i 1 kokcigealni). Svaki segment (osim prvog cervikalnog segmenta koji ima samo trbušni korijen) ima par dorzalnih i ventralnih korijena i par spinalnih živaca. Svaki dorzalni i ventralni korijen spajaju se u intervertebralne otvore kako bi formirali prolaz za kralježnički živac. Izvan leđne moždine i neposredno proksimalno od njenog spoja s ventralnim korijenom, dorzalni korijen ima ovalno proširenje, ganglij dorzalnog korijena, koji sadrži senzorne neurone (Bican i sur., 2013) o kojima je bilo više riječi u uvodnom dijelu ovoga rada. Dura mater, arahnoidna i pia mater su membrane koje pokrivaju leđnu moždinu od najpovršnijeg sloja do onog najbližeg leđnoj moždini (Bican i sur., 2013). Poprečni presjek leđne moždine odrasle osobe pokazuje bijelu tvar (živčana vlakana okružena mijelinskom ovojnicama) na periferiji, sivu tvar (sadrži trupove živčanih stanica i glija stanice) iznutra i sićušni središnji kanal ispunjen likvorom. Kanal okružuje jedan sloj stanica, endodimalni sloj. Oko endodimalnog sloja nalazi se siva tvar - regija koja sadrži stanična tijela - u obliku slova "H" ili "leptira". Dva "krila" leptira povezana su preko srednje linije dorzalnom sivom komisurama, tj. spojnicama. Oblik i veličina sive tvari variraju ovisno o razini leđne moždine. Na nižim razinama, omjer između sive i bijele tvari je veći nego na višim razinama, uglavnom zato što niže razine sadrže manje uzlaznih i silaznih živčanih vlakana. Siva tvar uglavnom

sadrži stanična tijela neurona i glije i podijeljena je u četiri glavna stupca: dorzalni rog, srednji stup, lateralni rog i stupac ventralnog roga (<https://nba.uth.tmc.edu/neuroscience/>).

### **4.1.1. Lumbalni segment**

U sklopu ovoga rada, imunohistokemijski su se obradili segmenti lumbalnog dijela leđne moždine (L3-L6).

Donji dio leđa sastoji se od lumbalne kralježnice, koju čine kosti kralježaka, međukralješni diskovi, živci, mišići, ligamenti i krvne žile. Leđna moždina završava na vrhu lumbalne kralježnice, a preostali korijeni živaca, koji se nazivaju *cauda equina*, spuštaju se niz ostatak spinalnog kanala (<https://www.spine-health.com/>). Lumbalni dio kralježnice ima idealnu strukturu za istovremeno optimiziranje funkcija pokretljivosti i stabilnosti. Ovaj dio kralježnice je čvrst i dizajniran je za nošenje težine glave, vrata, trupa i gornjih ekstremiteta.

Gledano odozgo, tijela kralješaka lumbalne kralježnice su velika i bubrežastoga oblika s konkavitom okrenutim prema stražnjoj strani. Međutim, L5 je više eliptičnog oblika. Gornje površine tijela kralješaka imaju mala uzdignuća duž njihovog stražnjeg ruba. Donje površine tijela kralježaka imaju dva mala zareza duž stražnjeg ruba. Volumen tijela lumbalnih kralježaka (prosječno 35 cm<sup>3</sup>; raspon od 19,7 do 61,5 cm<sup>3</sup>) veći je u muškaraca nego u žena i povećava se od L1 do L4, pri čemu L5 ima manji volumen od L4. Tijela kralješaka šira su s jedne na drugu stranu (bočna širina) nego sprijeda prema natrag (Cramer, 2014b). Peteljka kralješka je kratki dio debele i zaobljene kosti koja povezuje tijelo kralješka s lukom kralješka na stražnjoj strani. Vertebralni luk je stražnji dio kralješka koji sadrži koštani luk kralješka s otvorenim središnjim prostorom (Cramer, 2014a).

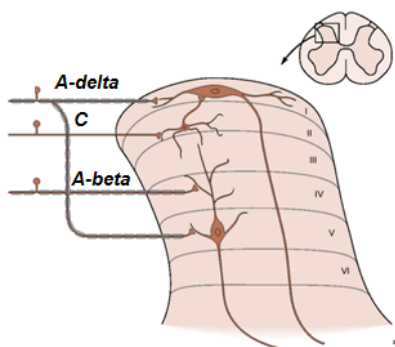
### **4.1.2. Dorzalni rog**

Gotovo sve osjetne informacije iz somatskih segmenata tijela ulaze u leđnu moždinu kroz dorzalne korijene spinalnih živaca. Međutim, od ulazne točke u moždinu i zatim do mozga, senzorni signali se prenose kroz jedan od dva alternativna senzorna puta: dorzalni stup-medijalni lemnisk sustav ili anterolateralni sustav. Dorzalni stup-medijalni lemnisk sustav sastavljen je od velikih, mijeliniziranih živčanih vlakana koja prenose signale u mozak brzinama od 30 do 110 m/s. Pri ulasku u leđnu moždinu kroz dorzalne korijene spinalnog živca,

velika mijelinizirana vlakna iz specijaliziranih mehanoreceptora gotovo se odmah dijele i tvore medijalnu granu i lateralnu granu. Medijalna grana skreće prvo medijalno, a zatim uzvodno u dorzalnom stupu, nastavljajući putem dorzalnog stupa sve do mozga. Lateralna grana ulazi u dorzalni rog sive tvari moždine, zatim se mnogo puta dijeli kako bi osigurala završetke koji stvaraju sinapse s lokalnim neuronima u intermedijarnom i prednjem dijelu sive tvari moždine (Guyton i Hall, 2006).

Neuroanatom po imenu Rexed promatrao je strukturu sive tvari leđne moždine i podijelio je na stupce stanica koje su bile slične jedna drugoj u različitim segmentima. Njegova zapažanja temeljila su se na obliku i veličini neurona, a on je podijelio sivu tvar u 10 slojeva (lamina), od kojih je 6 u dorzalnom rogu, označenim rimskim brojevima od I do VI. Klasifikacija je korisna jer različite lamine primaju neurone s različitim funkcijama (<http://humanphysiology.academy/index.html>).

Brza vlakna boli tipa A $\delta$  prenose uglavnom mehaničku i akutnu toplinsku bol. Završavaju uglavnom u lamini I (*lamina marginalis*) dorzalnog roga. S druge strane, sporu kroničnu bol prenose vlakna tipa C, iako neke signale prenose vlakana tipa A $\delta$ . U ovom putu, periferna vlakna završavaju u leđnoj moždini gotovo u cijelosti u laminama II i III dorzalnog roga, koji se zajedno nazivaju *substantia gelatinosa*. U laminama III i IV nalaze se neuroni koji stvaraju sinapse s nenocicepcijskim A $\beta$  vlaknima, koja u fiziološkim uvjetima prenose osjet dodira, ali i osjet boli u patološkim uvjetima središnje senzitivacije (Guyton i Hall, 2006). Zaključno, u samome kontekstu antinociceptivnog djelovanja BT-A, bilo je od interesa istražiti njegovu enzimsku aktivnost u laminama I-VI dorzalnog roga.



**Slika 4.** Prikaz dorzalnog roga i njegovih lamina (preuzeto i prilagođeno prema <https://nba.uth.tmc.edu/neuroscience/> )

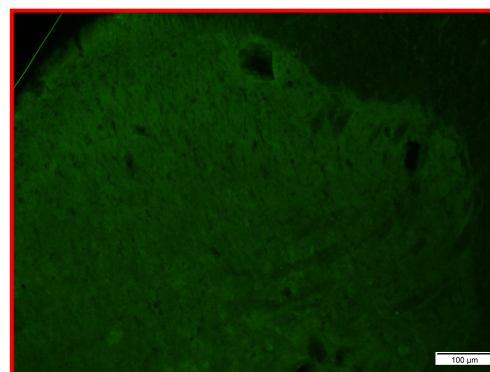
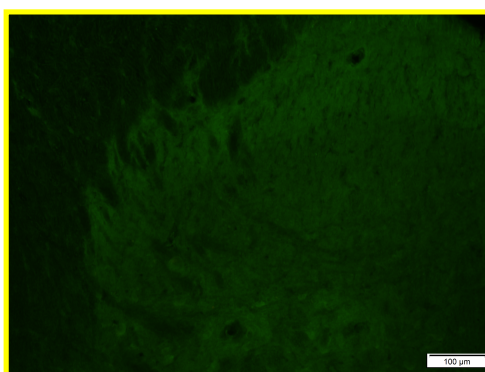
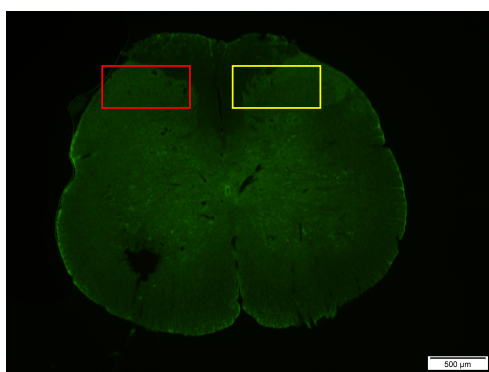
## 4.2. Imunoreaktivnost pocijepanoga SNAP-25 nakon i.pl. primjene BT-A

Nakon i.pl. primjene BT-A u karagenanskom modelu upale kod Wistar štakora, pristupilo se analizi pocijepanog SNAP-25 proteina (eng. *cleaved SNAP-25, cl-SNAP25*) u dorzalnome rogu kralješničke moždine dvije skupine štakora. Jednoj je skupini apliciran intratekalno konjski serum, a drugoj antitoksin, 24 h nakon i.pl. primjene BT-A. BT-A je primijenjen u desnu šapu štakora 7 dana prije karagenana (uzrok upalne boli) i žrtvovanja radi prikupljanja uzoraka.

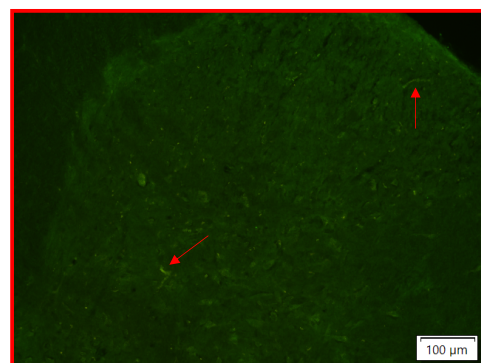
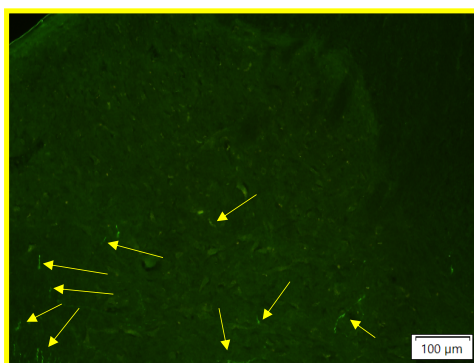
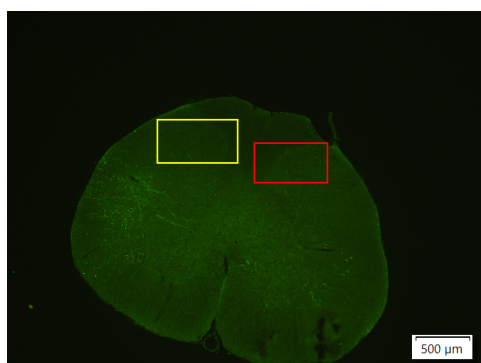
Od fotografija koje su dobivene nakon imunohistokemijske analize uzoraka/prereza i slikane pod određenim povećanjima na fluorescentnom mikroskopu, odabrane su one reprezentativne koje su dalje analizirane i signal je kvantificiran, sukladno opisanom u literaturi.

To se postiglo tako da su se za pojedinu životinju zbrojile vrijednosti površina pocijepanog SNAP-25 proteina (pomoću *Fiji Image J*) iz tri vidna polja pojedinog prereza, a iz vrijednosti tri prereza su potom dobivene srednje vrijednosti koje su se zbrojile po segmentima (L3 + L4 + L5/6). U kontrolnoj skupini gdje je primijenjena fiziološka otopina umjesto BT-A, nije došlo do cijepanja SNAP-25 proteina, što je sukladno s očekivanjima. Na Slici 5. prikazani su prerezi leđnih moždina vizualizirani fluorescentnim mikroskopom. Vrijednosti površine signala cl-SNAP-25 prikazane su numerički u Tablici 2. te Tablici 3. te grafički prikazane na Slici 6.

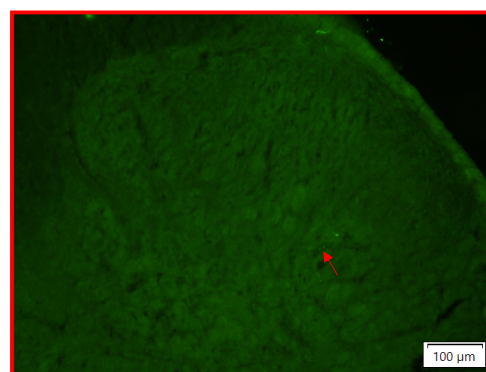
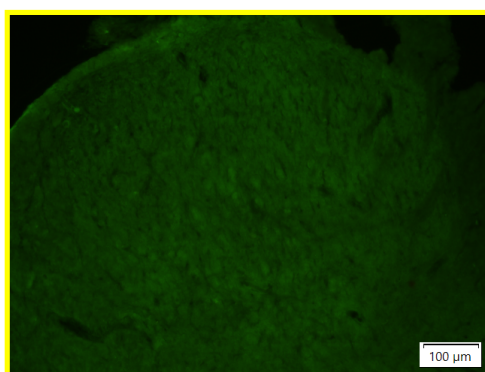
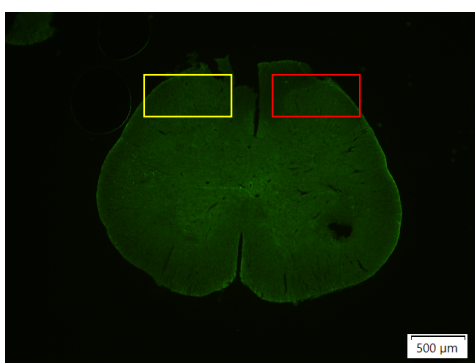
A)



B)



C)



**Slika 5.** Prerezi leđnih moždina vizualizirani fluorescentnim mikroskopom. Ipsilateralna strana prikazana je žutim obrubom, dok je kontralateralna strana prikazana crvenim obrubom. Na A) prikazu nalazi se kontrolna skupina (tretman s fiziološkom otopinom – bez signala). Na B) prikazu nalazi se skupina tretirana BT-A i konjskim serumom – signal vidljiv u obliku fluorescentnih vlakana (označeno strelicama). Na C) prikazu nalazi se skupina tretirana BT-A i anti-BT-A (smanjeni signal).



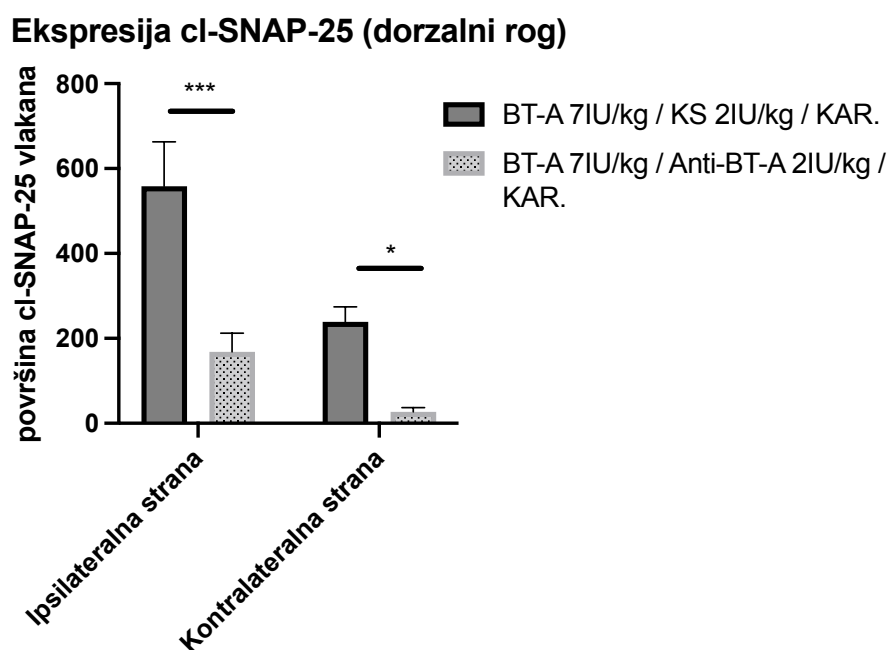
**Tablica 2.** Prikaz ekspresije cl-SNAP-25 u skupini u kojoj je primijenjen konjski serum (BT-A 7IU/kg / KS 2IU/kg / KAR) na ipsilateralnoj i kontralateralnoj strani dorzalnoga roga (n=5)

<b>Strana dorzalnog roga</b>	<b>Površina cl-SNAP-25 vlakana</b>				
Ipsilateralna strana	431,483	572,809	374,283	455,917	957,536
Kontralateralna strana	203,066	303,868	128,163	235,716	323,844

**Tablica 3.** Prikaz ekspresije cl-SNAP-25 u skupini u kojoj je primijenjen antitoksin (anti-BT-A) (BT-A 7IU/kg / Anti-BT-A 2IU/kg / KAR) na ipsilateralnoj i kontralateralnoj strani dorzalnoga roga (n=5)

<b>Strana dorzalnog roga</b>	<b>Površina cl-SNAP-25 vlakana</b>				
Ipsilateralna strana	91,676	326,236	157,115	82,562	185,108
Kontralateralna strana	62,05	62,05	21,545	16,618	2,862

Na slici 5. A) ne detektira se cl-SNAP25, što jest u skladu s očekivanjima pošto toj skupini životinja nije bio primijenjen BT-A. Nadalje, na slici 5. B) (skupina tretirana s BT-A i konjskim serumom - HS) očituje se najveća površina cl-SNAP25. Ekspresija pocijepanog proteina veća je u skupini tretiranoj s BT-A i HS nego u onoj tretiranoj s antitoksinom (slika 5. C). U tablicama 2. i 3. ,gdje su numerički prikazane površine cl-SNAP25 pojedine skupine životinja, potvrđuje se zaključak sa slike 5, tj. mjere se znatno veće površine u skupini tretiranoj BT-A i HS za razliku od one tretirane s BT-A i antitoksinom (Slika 6).



**Slika 6.** Grafički prikaz ekspresije cl-SNAP-25 u dorzalnom rogu s ipsilateralne i kontralateralne strane kod skupine s tretmanom BT-A 7 i.j./kg / KS 2 i.j./kg / KAR i kod skupine s tretmanom BT-A 7 i.j./kg / Anti-BT-A 2 i.j./kg / KAR

## 5. RASPRAVA

Otkriće mehanizma kojim BT-A uzrokuje trovanje, odnosno botulizam, omogućilo je njegovu terapijsku primjenu unazad tridesetak godina kod kliničkih stanja praćenih povećanom kontraktilnošću mišića (v. Uvod). Međutim, priča o njegovom antinociceptivnom djelovanju nije stala samo na „periferiji“. Luvisetto i suradnici (2006) prvi su demonstrirali antinociceptivni učinak BT-A nakon središnje (intracerebroventrikularne) primjene male doze BT-A u formalinskom testu kod miševa. Time su započeli i dalje otvorenu raspravu o središnjem djelovanju BT-A na bol. Daljnja su istraživanja imala za glavni cilj otkriti kako BT-A dopijeva s periferije do središnjeg živčanoga sustava te na koji način ispoljava svoje djelovanje.

Nekoliko je istraživanja u posljednjih 10 godina dalo čvrste bihevioralne, ali i imunohistokemijske dokaze o aksonalnom transportu BT-A s perifernog mjesta primjene u središnje strukture. Tako su Matak i sur. (2012) detektirali vlakna pozitivna na pocijepani SNAP-25 (marker aktivnosti BT-A) u ipsilateralnim ventralnim rogovima leđne moždine i dorzalnim rogovima. Vlakna su se pojavila nakon jednokratne primjene BT-A, čak i pri niskim intramuskularnim dozama (5 i.j./kg).

Nadalje, pitanje koje se i dalje istražuje je mehanizam središnjeg djelovanja BT-A. Bach-Rojecky i Lacković (2009) su pokazali u modelu formalinom uzrokovane upalne boli da BT-A nakon intratekalne primjene djeluje već u dozi od 0,5 i.j./kg, što je 7 puta manja doza od najmanje djelotvorne periferne, te da učinak BT-A nastupa 24 sata nakon intratekalne primjene, dok periferno primijenjen BT-A učinak postiže nakon 5 dana. U suprotnosti s rezultatima Luvisetta i sur. (2006), u pokusima Drinovac i sur. (2014. i 2016.) pokazano je da BT-A smanjuje visceralnu, odnosno bilateralnu mišićnu bol samo ako se primijeni periferno (i.pl. u šapu) ili intratekalno (i.t. u spinalni kanal) te da učinak izostaje ako se injicira supraspinalno (i.c. u cisternu magnu ili i.c.v. u moždane komore). Time se postavlja hipoteza o segmentalnom spinalnom djelovanju BT-A na bol. Mogući razlozi kontradiktornosti rezultata mogu biti različite korištene doze BT-A, ali i razlike među vrstama (štakor vs. miš), kao i korištenim modelima boli.

U pokusu u okviru ovog diplomskog rada potvrđen je aksonalni transport BT-A nakon periferne primjene. Detektirana je visoka imunoreaktivnost pocijepanoga SNAP-25 u vlaknima unutar analiziranih L3-L6 segmenata dorzalnoga roga leđne moždine skupine životinja kojima je nakon primjene BT-A apliciran konjski serum i.t.. Nadalje, u skupini gdje je primijenjen

anti-toksin (anti-BT-A) i.t. uočena je statistički manja površina pocijepanih SNAP-25 vlakna. Sukladno tome, zaključujemo da dolazi do neutralizacije samog toksina anti-toksinom. To može sugerirati „curenje“, tj. prelazak BT-A iz neurona u neuron (transsinaptički transport) na razini leđne moždine. To se pokazalo s ipsilateralne, ali i kontralateralne strane, što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima. Iako se ovim pokusom potvrđuje hipoteza o segmentalnom mjestu antinociceptivnog djelovanja BT-A na razini prve sinapse u spinalnim regijama leđne moždine, otvara se prostor novim istraživanjima o samome mehanizmu transporta BT-A na razini leđne moždine.

## 6. ZAKLJUČCI

Da je mjesto djelovanja središnji živčani sustav BT-A, ukazuju sve veći broj pretkliničkih studija, premda nije do kraja jasno na kojim sve razinama i dijelovima nociceptivnog puta BT-A interferira s prijenosom bolne informacije. Smatra se da je glavno mjesto djelovanja u leđnoj moždini, odnosno na razini prve sinapse u nociceptivnom putu. Poznato je da BT-A nakon periferne primjene aksonalnim transportom dolazi do dorzalnoga roga leđne moždine. Imunohistokemijska detekcija proteolitičke aktivnosti BT-A (detekcija pocijepanoga SNAP-25 proteina) u spinalnim strukturama dodatni je dokaz središnjega mjesta djelovanja BT-A na bol.

U ovom diplomskom radu imunohistokemijskom metodom istražen je potencijalni transsinaptički prijenos BT-A na razini leđne moždine u području dorzalnoga roga, tj. na razini prve sinapse u spinalnim regijama. Korišten je model karagenanom-uzrokovane upalne boli u štakora, uz prethodno jednostrano apliciran BT-A u desnu šapu (i.pl.). Metodom imunohistokemije promatrana je proteolitička aktivnosti BT-A (detekcija pocijepanoga SNAP-25 proteina) u spinalnim strukturama (poprečni prerezi leđne moždine L3-L6 segmenta). U skupini u kojoj je primijenjen konjski serum (neaktivna supstancija) uočena je značajna aktivnost BT-A, odnosno detektirana je velika količina pocijepanog SNAP-25. To je u skladu s dosadašnjim dokazima središnjega mjesta djelovanja BT-A na bol, tj. s hipotezom o segmentalnom djelovanju BT-A na bol nakon retrogradnog transporta s mjesta primjene u središnji živčani sustav. Nadalje, u skupini kojoj je primijenjen anti-toksin u spinalni kanal na razini L4-L5 uočena je značajno manja detekcija pocijepanog SNAP-25 proteina što upućuje na mogući transsinaptički transport BT-A.

Ova saznanja svakako otvaraju prostor za daljnja istraživanja o samim mehanizmima transporta BT-A, kao i stanicama (neuronima, glija stanicama) u koje BT-A moguće ulazi unutar središnjeg živčanog sustava.

## 7. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

Ach- acetilkolin

ACL- *engl. the anterior cruciate ligament*

AMPA -  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4- izoksazolpropionska kiselina

Anti-BT-A- antitijelo za botulinum toksin tipa A

ATP - adenzin trifosfat

BT-A -botulinum toksin tipa A

CFA- *engl. Complete Freund's adjuvant*

CGRP - peptid srodan genu za kalcitonin (*engl. Calcitonin Gene Related Peptide*)

cl-SNAP-25- *engl. cleaved SNAP-25*

CRF - faktor lučenja kortikotropina (*engl. Corticotrophin Releasing Factor*)

FDA- *engl. Food and Drug Administration*

F.O.- fiziološka otopina

GABA - gama-amino maslačna kiselina (*engl. Gamma-Amino Butyric Acid*)

HIV- *engl. Human Immunodeficiency Virus*

5-HT - serotonin (5-HidroksiTriptamin)

IASP - *engl. International Association for Study of Pain*

i.c.- u cisternu magnu

i.c.v.- u moždane komore

i.j. (U) - Internacionalna Jedinica

i.pl.- intraplantarno

i.t.- intratekalno

KAR- karagenan

KS- konjski serum

MIA- mononatrijev jodoacetat

NMDA - N-Metil-D-Aspartat

NO - dušik-2-oksidi (*engl. Nitric Oxid*)

NSAIL - NeSteroidni AntiInflamatorni Lijekovi

NSF -fuzijski protein osjetljiv na N-etilmaleimid

PBS- *engl. Phosphate-buffered saline*

poliHRP- *engl. polymerized horseradish peroxidase*

SNAP-25 - *engl. Synaptosomal Associated Protein 25 kDa*

SNARE - *engl. Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor*

SP - Supstanca P

SV2 -*engl. Synaptic Vesicle protein 2*

SŽS - Središnji Živčani Sustav

TRPV1 - vaniloidni receptor 1 (*engl. Transient Receptor Potential cation channel, subfamily Valliloid*)

VAMP- *engl. vesicle-associated membrane protein*

VIP - Vazoaktivni Intestinalni Peptid

WDR- *engl. Wide Dynamic Range Neurones*

## 8. LITERATURA

Anatomy of the Spinal Cord, 2020, dostupno na: <https://nba.uth.tmc.edu/neuroscience/>, pristupljeno: 12.6.2022.

Aoki KR, Guyer B. Botulinum toxin type A and other botulinum toxin serotypes: a comparative review of biochemical and pharmacological actions. *Eur J Neurol*, 2001, 5, 21-29.

Argoff CE, A focused review on the use of botulinum toxins for neuropathic pain. *Clin J Pain*. 2002, 177-181.

Arnon SS, Schechter R, Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, et al. Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA*, 2001, 285(8), 1059-1070.

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

Bach-Rojecky L, Lacković Z. Central origin of the antinociceptive action of botulinum toxin type A. *Pharmacol Biochem Behav*, 2009, 94(2), 234-238.

Barash JR, Arnon SS. A novel strain of *Clostridium botulinum* that produces type B and type H botulinum toxins. *J Infect Dis*, 2014, 209(2), 183-191.

Bican O, Minagar A, Pruitt AA. The spinal cord: a review of functional neuroanatomy. *Neurol Clin.*, 2013, 31(1), 1-18.

Blasi J, Chapman ER, Link E, Binz T, Yamasaki S, De Camilli P, Südhof TC, Niemann H, Jahn R Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature*, 1993, 365(6442), 160-163.

Burma NE, Leduc-Pessah H, Fan CY, Trang T. Animal models of chronic pain: advances and challenges for clinical translation. *J Neurosci Res*, 2017, 95(6), 1242-1256.



Cramer GD. General Characteristics of the Spine. In: *Clinical Anatomy of the Spine, Spinal Cord, and Ans.* Elsevier, 2014a, 15-64.

Cramer GD. The Lumbar Region. In: *Clinical Anatomy of the Spine, Spinal Cord, and Ans.* Elsevier, 2014b, 246-311.

Dorsal Horn Neurons and their Projections, dostupno na: <http://humanphysiology.academy/index.html>, pristupljeno: 12.6.2022.

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

Drinovac V, Bach-Rojecky L, Babić A, Lacković Z. Antinociceptive effect of botulinum toxin type A on experimental abdominal pain. *Eur J Pharmacol*, 2014, 745, 190-195.

Drinovac Vlah V, Bach-Rojecky L, Lacković Z. Antinociceptive action of botulinum toxin type A in carrageenan-induced mirror pain. *J Neural Transm*, 2016, 123(12), 1403-1413.

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.

Freund B, Schwartz M. Temporal relationship of muscle weakness and pain reduction in subjects treated with botulinum toxin A. *J Pain*, 2003, 4(3), 159-165.

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

Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*. Amsterdam, Saunders Elsevier, 2006, str. 571-590.

Harden RN. Chronic neuropathic pain: mechanisms, diagnosis and treatment. *Neurologist*, 2005, 11(2), 111-122.

Harper CB, Martin S, Nguyen TH, Daniels SJ, Lavidis NA, Popoff MR, et al. Dynamin inhibition blocks botulinum neurotoxin type A endocytosis in neurons and delays botulism. *J Biol Chem* , 2011, 286(41), 35966-35976.

Hodel, A. SNAP-25. *Int J Biochem Cell Biol*, 1998, 30(10), 1069-1073.

Ishikawa H, Mitsui Y, Yoshitomi T, Mashimo K, Aoki S, Mukuno K, Shimizu K. Presynaptic effects of botulinum toxin type A on the neuronally evoked response of albino and pigmented rabbit iris sphincter and dilator muscles. *Jpn J Ophthalmol*, 2000, 44(2), 106-109.

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

Jankovic J. Botulinum toxin in clinical practice. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2004, 75(7), 951-957.

Kádková A, Radecke J, Sørensen JB. The SNAP-25 Protein Family. *Neuroscience*, 2019, 420, 50-71.

Koltzenburg M, Wall PD, McMahon SB. Does the right side know what the left is doing? *Trends Neurosci* , 1999, 22(3), 122-127.

Lebeda FJ, Adler M, Erickson K, Chushak Y. Onset dynamics of type A botulinum neurotoxin-induced paralysis. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*, 2008, 35(3), 251-267.

Lee GI, Neumeister MW. Pain: Pathways and Physiology. *Clin Plast Surg*, 2020, 47(2), 173-180

Lim EC, Seet RC. Botulinum toxin, quo vadis? *Med Hypotheses*, 2007, 69(4), 718-723.

Lumbar Spine Anatomy and Pain, dostupno na: <https://www.spine-health.com/>, pristupljeno: 4.7.2022.

Luisetto S, Marinelli S, Lucchetti F, Marchi F, Cobianchi S, Rossetto O, Montecucco C, Pavone F. Botulinum neurotoxins and formalin-induced pain: central vs. peripheral effects in mice. *Brain Res*, 2006, 1082(1), 124-131.

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

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

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

Parestezija. *Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje*. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. [www.enciklopedija.hr](http://www.enciklopedija.hr), Pristupljeno 27. 4. 2022.

Ren K, Dubner R. Inflammatory Models of Pain and Hyperalgesia. *ILAR J*, 1999, 40(3), 111-118.

Sharma, R, Das, G. What is the minimum knowledge of pain medicine needed for other specialty?. *Journal on Recent Advances in Pain*, 2018, 4(1), 32-35.

Smolec, O., et al. Neurophysiology of pain in surgical patients. *Veterinarska stanica*, 2021, 52(2), 0-0

Sobel J. Botulism. *Clin Infect Dis*, 2005, 41(8), 1167-1173.

Spinal Cord, dostupno na: <https://www.merckmanuals.com/home>, pristupljeno 4.7.2022.

Thyssen A, Hirnet D, Wolburg H, Schmalzing G, Deitmer JW, Lohr C. Ectopic vesicular neurotransmitter release along sensory axons mediates neurovascular coupling via glial calcium signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107 (34), 15258-15263.

Tsui JK, Eisen A, Stoessl AJ, Calne S, Calne DB. Double-blind study of botulinum toxin in spasmodic torticollis. *Lancet*, 1986, 2(8501), 245-247.

Turton K, Chaddock JA, Acharya KR. Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. *Trends Biochem Sci*, 2002, 27(11), 552-558.

Welch MJ, Purkiss JR, Foster KA. Sensitivity of embryonic rat dorsal root ganglia neurons to *Clostridium botulinum* neurotoxins. *Toxicon*, 2000, 38(2), 245-258.

Xu J, Luo F, Zhang Z, Xue L, Wu XS, Chiang HC, Shin W, Wu LG. SNARE proteins synaptobrevin, SNAP-25, and syntaxin are involved in rapid and slow endocytosis at synapses. *Cell Rep*, 2013, 30;3(5), 1414-1421.

Yegappan R, Selvaprithviraj V, Amirthalingam S, Jayakumar R. Carrageenan based hydrogels for drug delivery, tissue engineering and wound healing. *Carbohydr Polym*, 2018, 98, 385-400.

## 9. SAŽETAK

Isprva samo smrtonosni toksin koji uzrokuje botulizam, BT-A se već više od 30 godina uspješno koristi u liječenju različitih bolesti, od čega je kronična bol indikacija koja se i dalje istražuje.

Iako se smatra jednim od najpotentnijih bioloških toksina, pročišćeni farmakološki pripravak BT-A u nanomolarnim dozama koristi se u liječenju različitih kliničkih stanja praćenih povećanom kontraktilnošću mišića. U pogledu liječenja boli, velika mu je prednost što nakon jednokratne primjene njegovo djelovanje traje do nekoliko mjeseci, te tu dobiva prednost nad poznatim analgeticima, naročito za liječenje kronične boli.

Dosadašnja istraživanja na modelima visceralne i bilateralne boli, u kojima je uočen bilateralni analgetski učinak BT-A nakon unilateralne periferne i intratekalne, ali ne i središnje intracerebroventrikularne i intracisternalne primjene, poslužili su kao temelj hipoteze o središnjemu segmentalnom analgetskom djelovanju BT-A na spinalnoj razini. Imunohistokemijski detektiran pocijepani SNAP-25 u dorzalnome rogu kralješnične moždine upućuje na retrogradni aksonalni transport s periferije do leđne moždine gdje onda ispoljava svoj antinociceptivni učinak tako što modulira prijenos bolnog impulsa senzornim vlaknima na razini prve sinapse u leđnoj moždini.

Ovim radom se imunohistokemijski detektirao pocijepani SNAP-25 u dorzalnome rogu leđne moždine nakon periferne primjene BT-A u desnu šapu štakora na karagenanskom modelu upalne boli. Nadalje, u skupini u kojoj je primijenjen antitoksin (i.t.) uočena je statistički manja količina pocijepanog SNAP-25 proteina, što sugerira mogući transsinaptički prelazak BT-A na razini leđne moždine. Ta saznanja svakako otvaraju prostor daljnjim istraživanjima o samome mehanizmu transinaptičkog transporta BT-A.

## SUMMARY

At first merely a lethal toxin which causes botulism, BT-A has been successfully used for more than 30 years in the treatment of various ailments, of which chronic pain is an indication that continues to be researched. Though considered to be one of the most potent biological toxins, its purified pharmacological preparation BT-A in nanomolar doses is used in treating various clinical conditions accompanied by augmented muscular contractility. With regard to pain treatment, it offers a significant advantage – after a single administration, its effects persist for several months, which gives it an edge over popular analgesics, especially for chronic pain treatment.

Previous research on visceral and bilateral pain models, which have shown a bilateral analgesic effect of BT-A after unilateral peripheral and intrathecal, but not central intracerebroventricular and intracisternal administration, has served as the foundation of the hypothesis on the central segmental analgesic effect of BT-A at the spinal level. Immunohistochemically detected cleaved SNAP-25 in the dorsal horn of the spinal cord indicates a retrograde axonal transport from the periphery to the spinal cord where it exhibits its antinociceptive effect by modulating pain impulse transmission via sensory fibers at the level of the first synapse in the spinal cord.

This paper has immunohistochemically detected cleaved SNAP-25 in the dorsal horn of the spinal cord after the peripheral administration of BT-A in the right footpad of rats in the carrageenan-induced inflammation model. Furthermore, the group in which the antitoxin was administered showed a statistically reduced amount of the cleaved SNAP-25 protein, which suggests the possibility of the transsynaptic transfer of BT-A at the level of the spinal cord. These observations invite further research into the transsynaptic transfer mechanism of BT-A.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

*Pocijepani SNAP-25 kao marker središnjeg mjesta djelovanja botulinum toksina tipa A na bol*

*Anna Ipša*

### SAŽETAK

Isprva samo smrtonosni toksin koji uzrokuje botulizam, BT-A se već više od 30 godina uspješno koristi u liječenju različitih bolesti, od čega je kronična bol indikacija koja se i dalje istražuje.

Iako se smatra jednim od najpotentnijih bioloških toksina, pročišćeni farmakološki pripravak BT-A u nanomolarnim dozama koristi se u liječenju različitih kliničkih stanja praćenih povećanom kontraktilnošću mišića. U pogledu liječenja boli, velika mu je prednost što nakon jednokratne primjene njegovo djelovanje traje do nekoliko mjeseci, te tu dobiva prednost nad poznatim analgeticima, naročito za liječenje kronične boli.

Dosadašnja istraživanja na modelima visceralne i bilateralne boli, u kojima je uočen bilateralni analgetski učinak BT-A nakon unilateralne periferne i intratekalne, ali ne i središnje intracerebroventrikularne i intracisternalne primjene, poslužili su kao temelj hipoteze o središnjemu segmentalnom analgetskom djelovanju BT-A na spinalnoj razini. Imunohistokemijski detektiran pocijepani SNAP-25 u dorzalnome rogu kralješnične moždine

upućuje na retrogradni aksonalni transport s periferije do leđne moždine gdje onda ispoljava svoj antinociceptivni učinak tako što modulira prijenos bolnog impulsa senzornim vlaknima na razini prve sinapse u leđnoj moždini.

Ovim radom se imunohistokemijski detektirao pocijepani SNAP-25 u dorzalnome rogu leđne moždine nakon periferne primjene BT-A u desnu šapu štakora na karagenanskom modelu upalne boli. Nadalje, u skupini u kojoj je primijenjen antitoksin (i.t.) uočena je statistički manja količina pocijepanog SNAP-25 proteina, što sugerira mogući transsinaptički prelazak BT-A na razini leđne moždine. Ta saznanja svakako otvaraju prostor daljnjim istraživanjima o samome mehanizmu transinaptičkog transporta BT-A.

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

Rad sadrži: 36 stranica, 6 grafičkih prikaza, 3 tablice i 48 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

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

Mentor: **Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutskobiokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutskobiokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Hrvoje Rimac**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Ana Babić Perhoč**, znanstveni suradnik/doktorand Sveučilišta u Zagrebu Medicinskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2022.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

*Cleaved SNAP-25 as a marker of central site of Botulinum toxin Type A action on pain*

*Anna Ipša*

### SUMMARY

At first merely a lethal toxin which causes botulism, BT-A has been successfully used for more than 30 years in the treatment of various ailments, of which chronic pain is an indication that continues to be researched. Though considered to be one of the most potent biological toxins, its purified pharmacological preparation BT-A in nanomolar doses is used in treating various clinical conditions accompanied by augmented muscular contractility. With regard to pain treatment, it offers a significant advantage – after a single administration, its effects persist for several months, which gives it an edge over popular analgesics, especially for chronic pain treatment.

Previous research on visceral and bilateral pain models, which have shown a bilateral analgesic effect of BT-A after unilateral peripheral and intrathecal, but not central intracerebroventricular and intracisternal administration, has served as the foundation of the hypothesis on the central segmental analgesic effect of BT-A at the spinal level. Immunohistochemically detected cleaved SNAP-25 in the dorsal horn of the spinal cord indicates a retrograde axonal transport from the periphery to the spinal cord where it exhibits its antinociceptive effect by modulating pain impulse transmission via sensory fibers at the level of the first synapse in the spinal cord.

This paper has immunohistochemically detected cleaved SNAP-25 in the dorsal horn of the spinal cord after the peripheral administration of BT-A in the right footpad of rats in the carrageenan-induced inflammation model. Furthermore, the group in which the antitoxin was administered showed a statistically reduced amount of the cleaved SNAP-25 protein, which suggests the possibility of the transsynaptic transfer of BT-A at the level of the spinal cord. These observations invite further research into the transsynaptic transfer mechanism of BT-A.

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

Thesis includes: 36 pages, 6 figures, 3 tables and 48 references. Original is in Croatian language.

Keywords: botulinum toxin, pain, SNAP-25, spinal segments, 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  
**Hrvoje Rimac, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ana Babić Perhoč, Ph.D.** *Research Associate/PhD fellow*, University of Zagreb School of Medicine

The thesis was accepted: July 2022.