

Distribucija botulinum toksina u središnjem živčanom sustavu

Komar, Barbara

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:163:448449>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-24**



Repository / Repozitorij:

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



Barbara Komar

**Distribucija botulinum toksina u središnjem
živčanom sustavu**

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.

Od srca se zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Lidiji Bach-Rojecky na svom prenesenom znanju, inspiraciji i strpljenju, kako tijekom izrade ovog diplomskog rada, tako i tijekom studiranja. Vaša strast prema polju Farmacije i predanost studentima je najveće nadahnuće u daljnjem profesionalnom životu.

Zahvaljujem se i asistentici Daliji Vađunec na pomoći pri izvođenju eksperimentalnog dijela ovog rada i tumačenju rezultata.

Veliko hvala svim mojim prijateljima koji su mi uljepšali protekle studentske dane.

Naposlijetku, najveće hvala izričem svojim roditeljima Damiru i Etelki te sestri Katarini na svom raumijevanju, podršci i bezuvjetnoj ljubavi koju su mi pružili tijekom školovanja.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Bol	1
1.1.1. Receptori za bol i signalni putovi u prijenosu bolnog podražaja	1
1.1.2. Neurotransmitori u prijenosu boli	4
1.1.3. Podjela boli	4
1.1.4. Senzitivizacija kao osnova razvoja kronične boli	6
1.1.5. Modulacija bolnog impulsa	7
1.1.6. Terapija boli	9
1.2. Botulinum toksin	10
1.2.1. Struktura botulinum toksina tipa A	11
1.2.2. Mehanizam djelovanja botulinum toksina tipa A	13
1.2.3. Klinička primjena botulinum toksina tipa A	15
2. OBRAZLOŽENJE TEME	17
3. MATERIJALI I METODE	18
3.1. Tkivo životinje	18
3.2. Ispitivana tvar – botulinum toksin tipa A	18
3.3. Eksperimentalni protokol	19
3.3.1. Priprema tkiva za imunohistokemijsku analizu	19
3.3.2. Kemikalije	19
3.3.3. Imunohistokemija	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	21
5. ZAKLJUČAK	30
6. LITERATURA	31
7. SAŽETAK	34
8. SUMMARY	35

1. UVOD

1.1. Bol

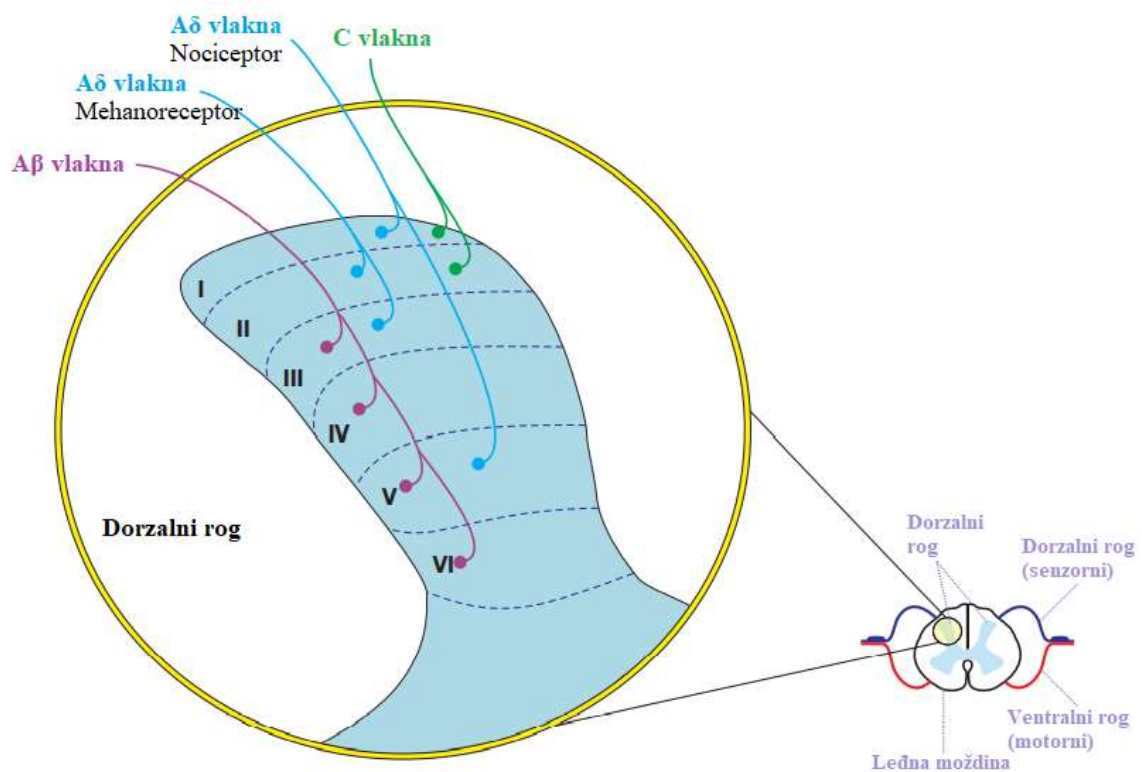
Bol je subjektivni, uznemirujući osjećaj često uzrokovan intenzivnim ili štetnim podražajima. Međunarodna udruga za istraživanje boli (engl. *International Association for the Study of Pain*, IASP) definira bol kao „neugodno osjetilno i emocionalno iskustvo povezano sa stvarnim ili potencijalnim oštećenjem tkiva ili slično onom povezanom sa stvarnim ili potencijalnim oštećenjem tkiva“. Bol se pojavljuje pri bilo kakvom oštećenju tkiva i potiče reakcije kojima se uklanja bolni podražaj, te ju smatramo zaštitnim mehanizmom pri svakodnevnoj funkciji organizma (Guyton i Hall, 2012).

1.1.1. Receptori za bol i signalni putovi u prijenosu bolnog podražaja

Receptori za bol ili nociceptori su slobodni živčani završeci. Velik broj ih se nalazi u površinskim slojevima kože, u unutarnjim tkivima (kao što su periost, arterijske stijenke, zglobne površine, falks i tentonij u lubanji), te manji broj u dubokim tkivima (Guyton i Hall, 2012). S obzirom na njihovu ulogu u nocicepciji, primarni aferentni neuroni imaju tri funkcije: otkrivanje štetnih podražaja (transdukcija), prolaz senzorskog impulsa do leđne moždine (provodljivost); i sinaptički prijenos istog impulsa u neurone unutar specifičnih lamina dorzalnog roga (prijenos). Senzorne informacije koje proizlaze iz štetnih podražaja zatim se prenose do supraspinalnih struktura uključujući talamus i moždano deblo (Kidd i Urban, 2001). Nociceptori imaju visok prag podraživanja i u fiziološkim uvjetima reagiraju samo na stimulanse koji mogu uzrokovati oštećenje tkiva. Pri dovoljno velikoj promjeni membranskog potencijala, otvaraju se ionski kanali kroz koje ioni ulaze u stanicu niz koncentracijski gradijent, mijenja se ionska propusnost, dolazi do razlike električnih naboja u i izvan stanice te nastaje akcijski potencijal koji putuje s periferije do kralježničke moždine, i naposljetku do mozga (Giroto i sur., 2012; Puljak i Sapunar, 2014). Za razliku od drugih osjetilnih receptora kod kojih pri dugotrajnom izlaganju podražaju dolazi do adaptacije, nociceptori se slabo ili nikako ne prilagođavaju na bolne podražaje (Guyton i Hall, 2012).

Neurone koji provode bolni impuls, dijelimo na temelju brzine provođenja akcijskog potencijala na skupinu mijeliniziranih A ($A\alpha/\beta$ i $A\delta$) i nemijeliniziranih, polimodalnih C-vlakana. Pod fiziološkim uvjetima, $A\beta$ vlakna reagiraju na neškodljive podražaje brzinom većom od 30 m/s, dok $A\delta$ vlakna prenose signale za brzu i oštru bol, pobuđuju se mehaničkim

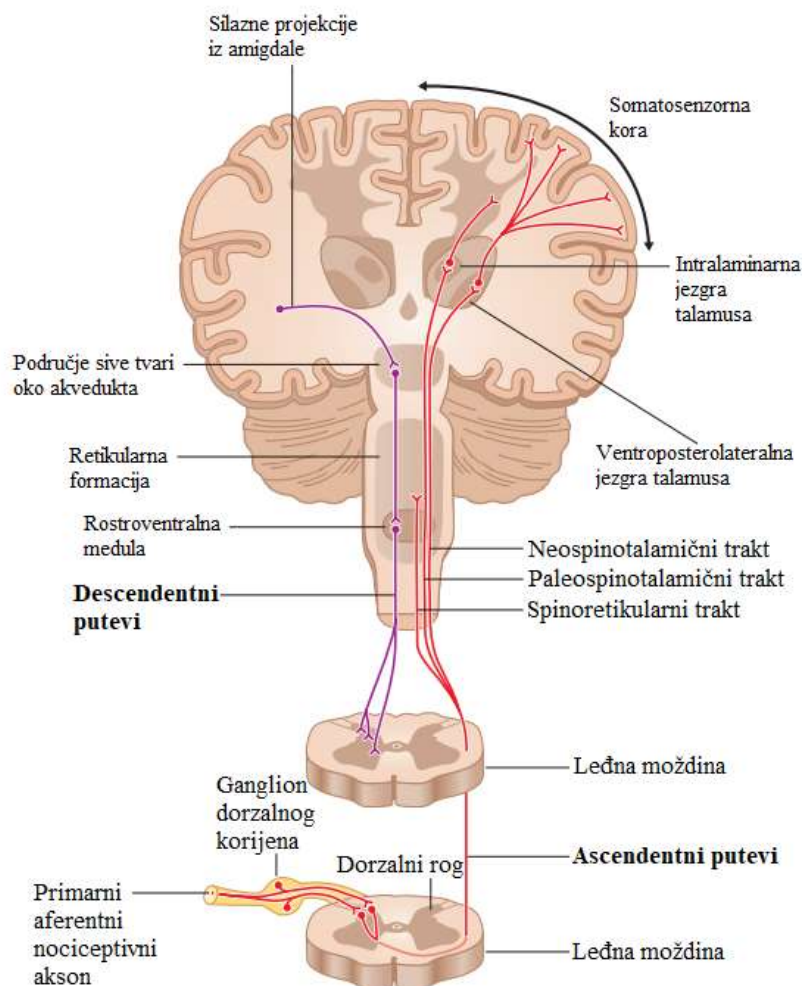
ili toplinskim bolnim podražajima prenose impuls do kralježničke moždine brzinom između 6 i 30 m/s. Nasuprot tome, C-vlakna prenose signale za sporu i trajnu bol u kralježničku moždinu brzinom između 0,5 i 2 m/s koja je najčešće pobuđena kemijskim bolnim podražajem. Bolni podražaj zbog navedenog dvostrukog sustava inervacije receptora često uzrokuje dvostruki osjet boli, zbog toga oštra bol uzrokuje reakciju odmicanja, a spora bol ima bitnu ulogu na uklanjanje izvora boli (Guyton i Hall, 2012; Kidd i Urban, 2001). Nakon podraživanja, primarna osjetna aferentna vlakna putuju duž perifernih živaca i ulaze u dorzalni rog kralježničke moždine te završavaju na sekundarnim osjetilnim neuronima koji su smješteni u Rexedove slojeve. Rexedovi slojevi, ili lamine, predstavljaju 10 citoarhitektonskih slojeva sive tvari u kralježničkoj moždini, a označavaju se rimskim brojevima od I do X (slika 1).



Slika 1. Prijenos brzih i sporih bolnih signala u kralježničku moždinu i kroz nju (preuzeto i prilagođeno prema Bullock i Hales(2013))

Nakon prekapčanja u jednoj od lamina, bolni signali prema mozgu putuju neospinotalamičnim ili paleospinotalamičnim traktom, ovisno o vrsti impulsa koje prenose (slika 2)(Puljak i Sapunar, 2014). Aδ vlakna završavaju u lamini I, koja se još naziva i

marginalnom regijom, te tu dolazi do pobuđivanja sekundarnog neurona neospinotalamičnog trakta. Akson prednjom komisurou prelazi na suprotnu stranu kralježničke moždine te se anterolateralnim kolumnama penje i prenosi brzi bolni impuls prema vazobazalnom kompleksu, stražnjoj skupini talamičnih jezgri i somato-senzoričkoj kori velikog mozga. Za razliku od A δ vlakana, C-vlakna prenose sporu i trajnu bol paleospinotalamičnim putem, čija vlakna završavaju u laminama II i III, koja se još naziva i gelatinoznom tvari. Signal se prenosi kroz jedan ili više interneurona unutar dorzalnog roga u laminu V na neurone čiji se aksoni pridružuju vlaknima brzog neospinotalamičnog puta, s kojima zajedno prelaze prednjom komisurou na suprotnu stranu kralježničke moždine, te kao i brzi impulsi, prema mozgu se penju anterolateralnim putem. Većina vlakana koja prenose sporu bol završava u retikularnim jezgrama produljene moždine, ponsa i mezencefalona, u tektalnom području ili u sivom području oko akvedukta, a tek četvrtina vlakana dolazi do talamusa (Guyton i Hall, 2012).



Slika 2. Prijenos bolnih signala neospinotalamičnim i paleospinotalamičnim putevima (preuzeto i prilagođeno prema Bullock i Hales(2013))

1.1.2. Neurotransmitori u prijenosu boli

Neurotransmitori su kemijske molekule koje služe za prijenos signala u središnjem živčanom sustavu. Drugim riječima, neurotransmitore možemo smatrati “riječima” kojima komuniciraju neuroni. Izlučuju se na završecima presinaptičkog neurona u sinaptičku pukotinu te utječu na receptore smještene na membranama postsinaptičkog neurona gdje imaju eksitacijsko ili inhibitorno djelovanje (Guyton i Hall, 2012). Glavni eksitacijski neurotransmitor je glutamat, a djeluje preko ionotropnih AMPA (α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kiselina) receptora. Ponavljajući bolni podražaji posreduju djelovanje glutamata i preko NMDA (N-metil-D-aspartat) receptora, čija je aktivacija povezana s povećanom eksitacijom neurona dorzalnog roga. Osim niskomolekularnih prijenosnika brzog djelovanja koji djeluju kao sinaptički prijenosnici, iz središnjih završetaka primarnih aferentnih neurona izlučuje se i neuropeptid supstancija P (SP) koji ima značajnu ulogu u prijenosu bolnog podražaja. Njeno djelovanje je znatno sporije i uvjetovano većim intenzitetom podražaja, te djelujući u dorzalnog rogu stvara veći postsinaptički odgovor i pojačava aktivnost NMDA receptora (Bach-Rojecky, 2006; Kidd i Urban, 2001). Osim prethodno navedenih, u transmisiji bolnih podražaja značajno djelovanje imaju i CGRP (peptid povezan s genom kalcitonina, engl. *calcitonin gene-related peptide*), tahikini, somatostatin, faktor lučenja kortikotropina (CRF), kolekistokinin, galanin i vazoaktivni intestinalni peptid (VIP). Od medijatora, koji imaju posredni učinak prijenos bolnih signala, senzitivirajući ili inhibirajući njihovo djelovanje, mogu se istaknuti adenzin tri-fosfat (ATP), dušikov (II) oksid (NO) i prostaglandini (PG) (Millan, 1999).

1.1.3. Podjela boli

Zbog svoje komplicirane i subjektivne prirode, bol je teško klasificirati na jedinstveni način. Radi lakše procjene boli i dijagnoze uzroka, bol možemo podijeliti prema porijeklu, trajanju, etiologiji ili patofiziologiji, intenzitetu i simptomima. Prema porijeklu, bol može biti kutana, mišićna, visceralna i dr., prema trajanju razlikujemo akutnu i kroničnu bol, a prema intenzitetu, sukladno smjernicama Svjetske zdravstvene organizacije (WHO), bol dijelimo na blagu, umjerenu i tešku.

Akutna bol je neugodna psihofiziološka pojava kratkog trajanja i obično je odgovor na traumu tkiva i srodne upalne procese, ima jasnu ulogu u zaštiti organizma od intrizičnih ili ekstrizičnih štetnih utjecaja i nestaje nakon zacjeljenja oštećenog tkiva. Za razliku od akutne,

kronična bol je bol čije je trajanje duže od 3 mjeseca u kontinuitetu (prema Međunarodnoj klasifikaciji bolesti 11. revizija, engl *International Classification of Diseases 11th Revision*, ICD-11), te nema jasnu zaštitnu ni evolucijsku ulogu u obrani organizma. Nastanak kronične boli može biti povezan s ozbiljnom progresivnom bolešću, kao što je karcinom, ili nastaje kao posljedica medicinskog stanja, primjerice amputacije ili herpes zoster, i često je posljedica komplicirane i nedovoljno razjašnjene etiologije, kao što su poremećaji u radu živčanog sustava. Kronična bol se sama po sebi smatra bolešću koja ima negativan utjecaj na kvalitetu života te fizičko i psihičko zdravlje pacijenta (Cohen i sur., 2021).

Prema etiološkoj podijeli, razlikujemo nociceptivnu, upalnu i neuropatsku bol. **Nociceptivna bol** je uzrokovana stimulacijom specifičnih živčanih završetaka (nociceptora). Nociceptori reagiraju na različite podražaje, kao što su promjene u temperaturi, mehanički i kemijski stimulus, ali se smatraju stanicama visokog praga, što znači da samo stvarno oštećenje tkiva može izazvati signal dovoljnog intenziteta da aktivira prijenos informacije preko dorzalnog roga do mozga. (Bullock i Hales, 2013). Glavna uloga nociceptivne boli je upozoriti organizam na potencijalna oštećenja tkiva (Bach-Rojecky, 2006).

Kao i nociceptivna, **upalna bol** također ima prilagodljivu i zaštitnu ulogu, a uzrokovana je aktivacijom imunološkog sustava ozljedom tkiva ili infekcijom. Nakon oštećenja tkiva, ona pomaže u ozdravljenju ozlijeđenog dijela tijela tako što pojačava podražljivost receptora na bol, smanjuje oštećenja i potiče oporavak (Woolf, 2010). Tijekom ozljede tkiva i upale, na periferiji iz oštećenih i imunskih stanica dolazi do lučenja raznih proupalnih medijatora, kao što su histamin, serotonin, bradikinin, prostaglandini, citokini, NGF (faktor rasta neurona), dušikov oksid, ATP i vodikovi ioni. Neke od navedenih tvari direktno aktiviraju periferne nociceptore (serotonin, ATP i vodikovi ioni), dok druge djeluju kao senzitivatori i povećavaju osjetljivost receptora za ostale neurotransmitore (prostaglandini). Posljedično se smanjuje prag aktivacije nociceptora, dok se povećava podražljivost membrane aferentnog završetka, što pridonosi perifernoj senzitivaciji. Neuropeptidi SP i CGRP otpuštaju se iz neurona, uzrokuju dilataciju i ekstravazaciju plazme te imaju široki spektar učinaka unutar perifernih tkiva i pridonose upali. Glutamat, kojeg smatramo dominantnim središnjim neurotransmitorom, i SP se otpuštaju iz središnjih završetaka primarnih aferentnih živaca tijekom upalnih stanja i induciraju dugotrajne promjene u podražljivosti dorzalnog roga. Time dovode do procesa centralne senzitivacije koju karakterizira povećana podražljivost sekundarnog neurona, pretjerani odgovor na normalne podražaje, proširenje veličine receptivnog polja i smanjenje praga za aktivaciju

novim podražajima. Tijekom upale može doći i do aktivacije tzv. tihih („silent“) C-nociceptora koji se ne aktiviraju u fiziološkim uvjetima, no djelovanjem medijatora upale, oni se senzitiviraju i odgovaraju na podražaje niskog i visokog intenziteta. Ukoliko je izvor upale dugotrajan, nastala središnja senzitivizacija u dorzalnom rogu čini bol ireverzibilnom i kroničnom, te dolazi do nastanka stanja povećane osjetljivosti na bolne podražaje (hiperalgezija) i na podražaje koji inače nisu bolni (alodinija) (Kidd i Urban, 2001; Bach-Rojecky, 2006).

Neuropatska bol nastaje zbog sekundarnih promjena u živčanom sustavu koje su izazvane lezijom ili može biti uzrokovana bolešću perifernog i/ili centralnog somatosenzornog živčanog sustava, kao to su dijabetes, kronični alkoholizam, HIV, ozljeda kralježničke moždine itd. U usporedbi s nociceptivnom boli, neuropatska bol obično je povezana s osjetilnim abnormalnostima, kao što su hiperalgezija, alodinija, i brojnim drugim bolnim paroksizmima. Glavne karakteristike neuropatske boli se klinički mogu podijeliti na kombinaciju pozitivnih i negativnih simptoma. Pozitivni simptomi uključuju različite bolne fenomene, kao što su parastezija i/ili diestezija, koji su oblik poremećenih osjetnih doživljaja, a javljaju se u obliku trnaca, iglica, mravinjanja, bockanja, žarenja ili pečenja. Negativni simptomi obično uključuju neurološki osjetilni deficit u bolnom području, zajedno s drugim motoričkim ili kognitivnim deficitom (Bouhassira, 2018; Cohen i sur., 2021).

1.1.4. Senzitivizacija kao osnova razvoja kronične boli

Receptori za bol, za razliku od većine drugih osjetilnih receptora, se ne prilagođavaju na bolni podražaj prilikom dugotrajnog izlaganja, već se njihova osjetljivost može i povećati, te prijeći iz akutne u kroničnu (Guyton i Hall, 2012). Procesi periferne i središnje senzitivizacije, prethodno spominjani, karakteriziraju upalnu i neuropatsku bol.

Periferna senzitivizacija predstavlja povećanu osjetljivost i smanjeni prag aktivacije prijenosa impulsa putem aferentnih nociceptivnih neurona na periferiji na stimulaciju bolnih podražaja. Prilikom ozljede tkiva, osim bolnog impulsa, dolazi i do otpuštanja upalnih medijatora iz oštećenih stanica, kao što su vodikovi i kalijevi ioni, bradikinin, histamine, serotonin, ATP i dušikov oksid. Stanice epitela i leukociti izlučuju prostaglandine, leukotriene, citokine i faktore rasta. Neki od navedenih medijatora izravno aktiviraju periferne nociceptore, dok drugi preko upalnih stanica posredno stimuliraju prienos bolnog impulsa. Periferno oslobođeni medijatori upale se vežu za metabotropne receptore spregnute s G-

proteinima na membranama perifernih aferentnih završetaka i započinju prenošenje signala preko sustava drugih glasnika. Time dolazi do aktivacije protein kinaza koje fosforiliraju ionske kanale i receptore, čime se smanjuje prag aktivacije receptora, a podražljivost membrane perifernih aferentnih neurona se povećava (<https://www.iasp-pain.org/>).

Središnja senzitivacija označava povećanu podražljivost neurona drugog reda u središnjem živčanom sustavu na normalni podražaj, a nastaje kao posljedica dugotrajne ili opetovane periferne senzitivacije koja dovodi do značajnih promjena u funkciji i aktivnosti središnjih neurogenih putova. Prilikom pojačanog bolnog impulsa, brza središnja senzitivacija nastaje uslijed lučenja glutamata iz perifernog aferentnog neurona, čime on uz AMPA receptore također aktivira i NMDA receptore. Posljedično, dolazi do pojačane sinteze i otpuštanja SP-a, koji djeluje na postsinaptičke neurone, ali i na periferiji na presinaptičkim okončinama aferentnih neurona preko autoreceptora, pojačavajući opet lučenje glutamata. Prilikom središnje senzitivacije, glija stanice postaju metabolički aktivne i počinju lučiti proupalne medijatore te time dodatno povećavaju lučenje ekscitacijskih neurotransmitora. Odgođena središnja senzitivacija nastaje kao posljedica transkripcijskih promjena u neuronima dorzalnog roga kraljeznične moždine. Dolazi do pojačanog stvaranja živčanog čimbenika rasta (NGF, engl. *nerve growth factor*) koji potiče promjene u vezama između neurona dorzalnog roga i do aktivacije transkripcijskih gena koji uzrokuju hiperreaktivnost dorzalnog roga na neuromodule. Konačni rezultat navedenih promjena očituje se u pretjeranom odgovoru na normalne podražaje, smanjenju aktivacijskog praga novim podražajima i proširenju veličine receptivnog polja i osjeta na udaljena područja (Bach-Rojecky, 2006; Kidd i Urban, 2011; Woolf i Costigan, 1999).

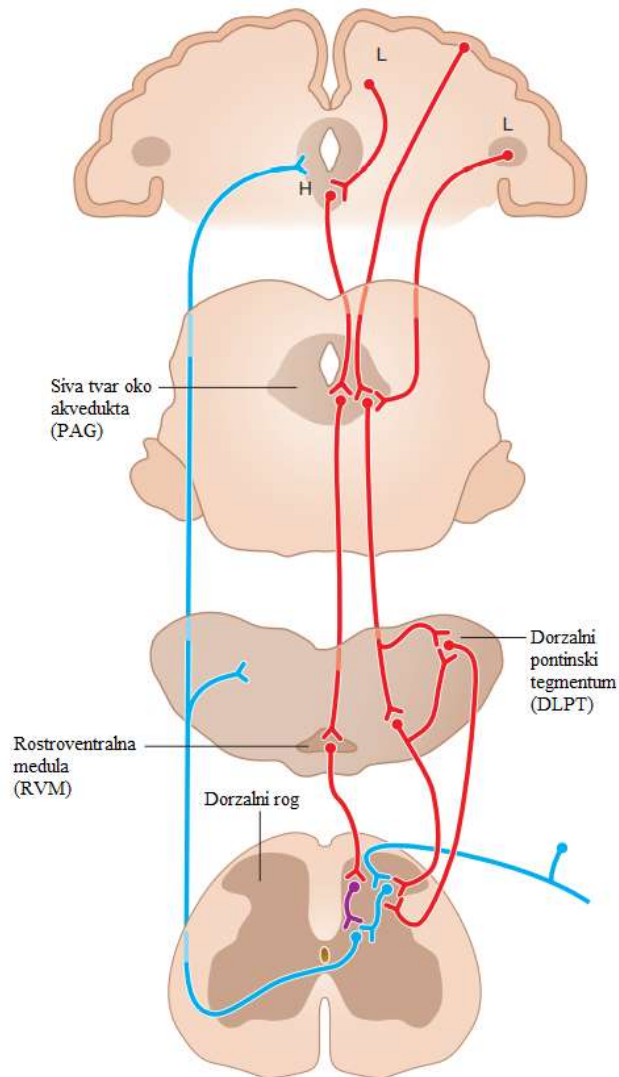
1.1.5. Modulacija bolnog impulsa

Intenzitet reakcije na bolni podražaj razlikuje se između pojedinaca, što je posljedica sposobnosti mozga da se prilikom pojave ascendentnog bolnog impulsa aktivira descendentni modulacijski sustav boli. Opisana su tri važna mehanizma analgetskog sustava: segmentalna inhibicija, silazni inhibicijski živčani sustav i endogeni opioidni sustav.

Prilikom prijenosa bolnog impulsa, istodobnim podraživanjem A β -vlakana koja su odgovorna za prijenos ne-nociceptivnih podražaja, dolazi do potiskivanja prijenosa bolnih signala iz tog područja tijela. Do smanjenja percepcije boli dolazi aktivacijom inhibicijskih interneurona u dorzalnog rogu kraljeznične moždine koji smanjuju transmisiju bolnih

informacija. Navedeni sustav kontrole boli se naziva **segmentalnom inhibicijom** (još poznati kao “gate theory”) i predstavlja razlog zbog kojega je osjet boli smanjen prilikom laganog trljanja kože u blizini bolnog mjesta (Guyton i Hall, 2012).

Descendentni, silazni putevi mogu inhibirati ili pojačavati transmisiju u dorzalnom rogu kralježnične moždine, te tako reguliraju provođenje nociceptivnih informacija do mozga. Neuron koji provode inhibicijski signal povezan s analgezijskim sustavom mozga prolaze od sive tvari oko akvedukta (engl. *periaqueductal grey*, PAG) i periventrikularne jezgre (engl. *paraventricular nucleus*, PVN) do velike jezgre rafe (engl. *nucleus raphe magnus*, NRM) i locus coeruleusa (LC), gdje se prekapčaju na neuron koji dalje putuje do kralježničke moždine (slika 3). U dorzalnom rogu do inhibicije signala dolazi između sinapsa A δ i C-vlakana i neurona ascendentnog puta, te između interneurona koji se nalaze u području gelatinozne tvari. Neuron iz PAG, PVN i NRM na svojim završecima luče enkefaline, koji uz endorfine i dinorfine, spadaju u **endogeni opioidni sustav**, a neuron koji potječu iz LC-a kao inhibitornu molekulu luče noradrenalin. Neuron u dorzalnom rogu koji dobivaju signale iz tih područja na svojim krajevima luče serotonin, koji pak lokalne neurone potiče na lučenje enkefalina. Enkefalin i noradrenalin na presinaptičkim neuronima inhibiraju otpuštanje neurotransmitora iz A δ i C-vlakana, dok enkefalin, noradrenalin, i serotonin na postsinaptičkim neuronima hiperpolariziraju neurone, povećavajući prag aktivacije. Na taj način u stražnjim rogovima analgezijski signali mogu zaustaviti bolne signale prije nego što se prekopčaju iz aferentnih neurona i krenu anterolateralnim putem prema mozgu (Guyton i Hall, 2012; Bullock i Hales, 2013).



Slika 3. Descendentni sustav za kontrolu boli (preuzeto i prilagođeno prema Bullock i Hales(2013))

1.1.6. Terapija boli

Doživljaj boli vrlo je varijabilan i individualan, stoga i terapija boli mora biti individualizirana i temeljena na pravilnoj evaluaciji te multidisciplinarnom pristupu u liječenju. Bazu liječenja čini farmakoterapijski pristup uz psihološku terapiju, dok su invazivne i destruktivne metode liječenja zadnji terapijski izbor. Svrha medikamentnog liječenja je ukloniti ili što je moguće bolje ublažiti bol, smanjiti patnju i time poboljšati kvalitetu življenja. Neadekvatno i nedovoljno brzo liječenje može imati za posljedicu prijelaz akutne boli u kroničnu, čime se terapijske opcije znatno smanjuju. Svjetska zdravstvena organizacija izradila je trostupanjsku ljestvicu koja služi kao algoritam za terapiju boli

uzrokovane malignim bolestima, no taj algoritam je primjenjiv i na terapiju akutne i kronične boli. Prvi korak predstavlja blagu bol za čije je liječenje preporučena upotreba neopioidnih, nesteroidnih protuupalnih lijekova (NSAIL) i paracetamola. U drugom koraku se za liječenje blage do umjerene boli preporuča upotreba slabih opioidnih analgetika, kao što je tramadol, uz dodatak NSAIL po potrebi, dok se u trećem koraku za terapiju umjerene do jake boli savjetuje upotreba jakih opioidnih analgetika, te prema potrebi i dodatak neopioidnog analgetika. Nesteroidni protuupalni lijekovi blokiraju sintezu prostaglandina inhibicijom ciklooksigenaze (COX), te posljedično smanjuju nastajanje bolnih impulsa na periferiji i smanjuju upalu, dok opioidni lijekovi djeluju na opioidne receptore u središnjem živčanom sustavu kako bi promijenili percepciju boli. Poznato je da kombinacija NSAIL-a i opioidnog analgetika u nižim dozama često pruža sinergistički i učinkovitiji tretman boli s manjim nuspojavama od primjene većih doza navedenih lijekova pojedinačno. Ukoliko terapija boli nije dostatna, u svakom koraku je moguća i dodatna primjena adjuvantnih analgetika, kao što su lokalni anestetici, triciklički antidepresivi i antiepileptici. Dodatne terapijske mogućnosti uključuju i upotrebu električne stimulacije, relaksacijske tehnike i prilagođeno vježbanje (Persoli-Gudelj i sur., 2016; Bullock i Hales, 2013).

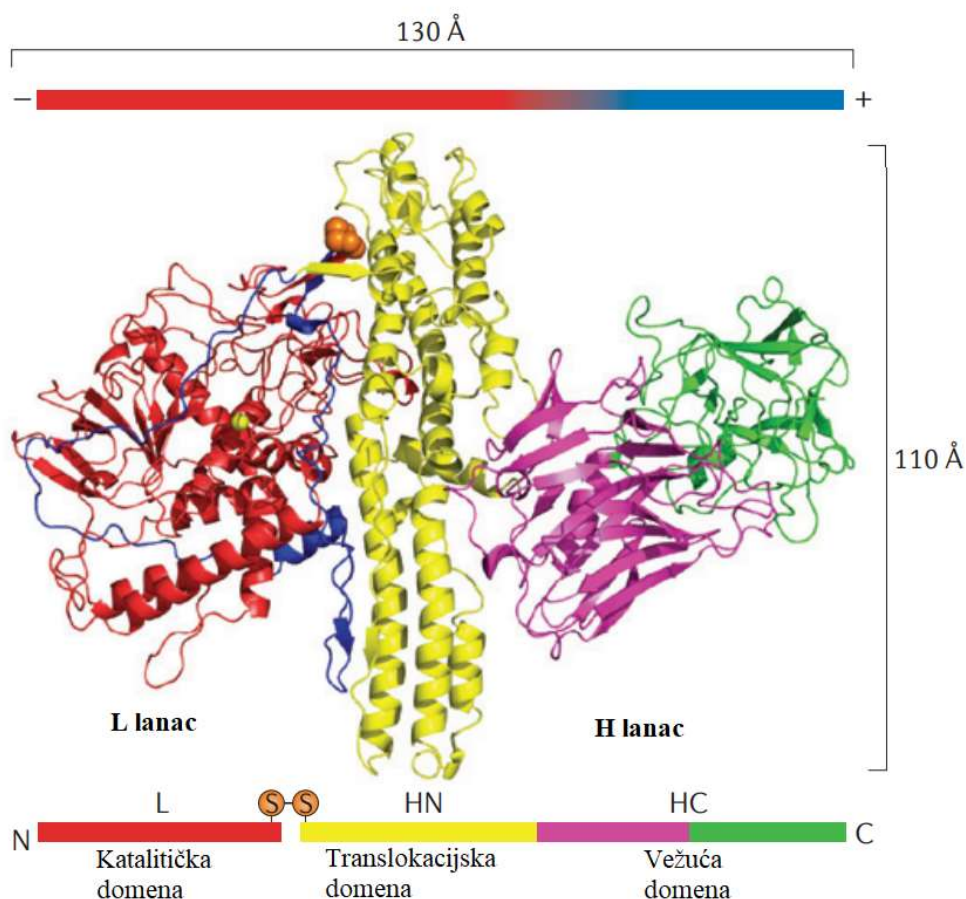
1.2. Botulinum toksin

Botulinum toksin (BoNT) je neurotoksični protein koji proizvode sojevi gram-pozitivnih sporogenih bakterija roda *Clostridium* (*C. botulinum*, *C. butyrricum*, *C. barati* i *C. argentinensis*) u anaerobnim uvjetima. Poznato je i okarakterizirano sedam serotipova botulinum toksina, označenih od A do G, pri čemu je serotip A najjačeg djelovanja. Botulinum toksini denaturiraju se zagrijavanjem na visokim temperaturama, dok su spore otporne na toplinu. Nakon što se neurotoksin apsorbira u probavnom traktu, hematogeno se širi do perifernih živčanih završetaka, gdje uzrokuje bolest nazvanu botulizam (Pirazzini i sur., 2017; Said i sur., 2003). Prijašnjih godina je izoliran i okarakteriziran osmi, do sada nepoznati H serotip neurotoksina (Barash i Arnon, 2014). Epidemiološki je poznato da samo A, B, E i F mogu uzrokovati botulizam kod ljudi. Do izloženosti toksinima može doći nakon gutanja hrane kontaminirane sa sporama *C. botulinum* i kolonizacije GI trakta (botulizam dojenčadi) ili s već formiranim toksinom (trovanje hranom). Botulizam koji se prenosi hranom najčešći je oblik botulizma. Neurotoksin se može otkriti u serumu 2 dana do 2 tjedna nakon pojave simptoma. Toksin je metaloproteinaza koja djeluje na krajevima aksona na neuromuskularnom spoju gdje sprječava egzocitozu neurotransmitora acetilkolina iz vezikula,

što za posljedicu ima nastanak mlohave paralize mišića (Kumar i sur., 2016). Bolest je karakterizirana mišićnom slabošću, zamagljenim vidom, teškoćama pri disanju i gutanju, a u fatalnim slučajevima, paraliza mišića može dovesti do potpunog prestanka disanja (Timbrell, 2009). Usprkos svojoj velikoj toksičnosti, primjena botulinum toksina tipa A i B, zbog reverzibilnog miorelaksirajućeg djelovanja u kontroliranim uvjetima i pikomolarnim dozama pokazuje korist u terapiji velikog broja medicinskih stanja uzrokovanih hiperaktivnosti mišića, autonomnih disfunkcija, kronične migrene, uroloških poremećaja, te u kozmetičke svrhe (Jabbari, 2015; Kumar i sur., 2016). Značajna su i istraživanja primjene botulinum toksina u terapiji kronične boli.

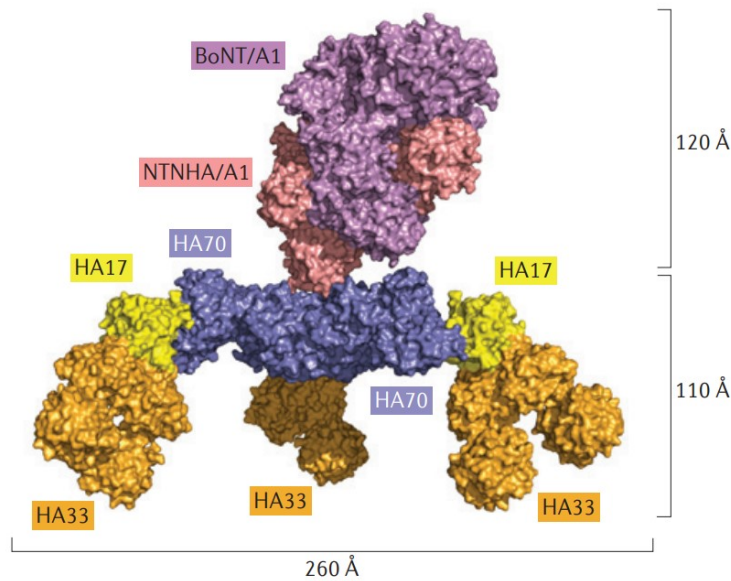
1.2.1. Struktura botulinum toksina tipa A

Botulinum toksin tipa A (BoNT/A) čini kompleks proteina veličine 900 kDa, a sastoji se od biološki aktivnog dijela i inaktivnih kompleksirajućih proteina, proteina povezanih s neurotoksinom (engl. *neurotoxin-associated proteins*, NAPs). Biološki aktivna komponenta, molekulske mase 150 kDa, sastoji se od lakog lanca (LC) i teškog lanca (HC) koji su povezani disulfidnom vezom na položaju Cys430-Cys454 (slika 4). Laki lanac veličine 50 kDa ima katalitičku domenu i djeluje kao endopeptidaza ovisna o cinku, dok teški lanac veličine 100 kDa sadrži dvije funkcionalne domene, svaku od 50 kDa. N-terminalni dio teškog lanca (HN) je translokacijska domena, čija je funkcija stvaranja ionskih kanala u lipidnim dvoslojevima, a C-terminalna polovica teškog lanca (HC) je domena za vezanje gangliozida, koja ima ključnu ulogu u vezanju na membranu ciljne stanice i za internalizaciju molekula toksina u kolinergičke neurone. Tri funkcionalne domene su strukturno različite i raspoređene na linearan način, tako da nema kontakta između katalitičke i vezujuće domene (Rossetto i sur., 2014; Turton i sur., 2002).



Slika 4. Struktura botulinum toksina tipa A (preuzeto i prilagođeno prema Rossetto i sur.(2014))

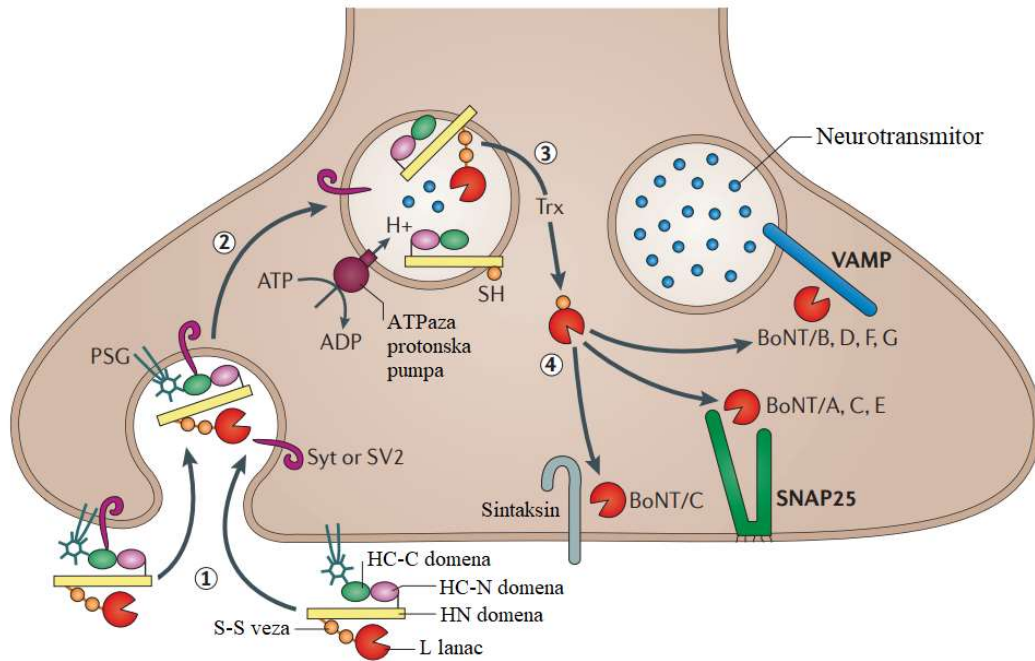
Netoksični dio kompleksa štiti toksin od inaktivirajućih čimbenika, primjerice želučane kiseline, visoke temperature i proteaza, čime povećava oralnu toksičnost botulinum toksina. NAPs se sastoji od hemaglutininskih proteina (HA proteina) i ne-hemaglutininskih proteina (NTNHA proteina) (slika 5). NTNHA dio kompleksa doprinosi stabilnosti toksina u kiseloj sredini i pruža zaštitu od proteaza u gastrointestinalnom sustavu, dok su HA protein uključeni u translokaciju BoNT/A preko intestinalne epitelne ovojnice u limfni sustav i krvotok (Matak i sur., 2019). Ne-hemaglutininska proteinska frakcija uključuje specifične antigenske proteine koji su izvor stvaranja antitijela protiv toksina nakon BoNT terapije. Antigeni koje organizam može stvoriti nakon terapije ili trovanja botulinum toksinom uglavnom su protiv specifičnih proteina ne-hemaglutininske frakcije (Jabbari 2015; Jin i sur., 2009).



Slika 5. Struktura proteinskog kompleksa BoNT/A (preuzeto iz Rossetto i sur.(2014))

1.2.2. Mehanizam djelovanja botulinum toksina tipa A

Botulinum toksin (BoNT) djeluje kao metaloproteinaza koja ulazi u periferne kolinergičke živčane završetke i cijepa proteine koji su ključne komponente sustava za neuroegzocitozu, uzrokujući dugotrajnu, ali reverzibilnu inhibiciju otpuštanja neurotransmitora. Točan molekularni mehanizam djelovanja BoNT-a još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, ali na temelju postojećih eksperimentalnih dokaza, vjeruje se da se intoksikacija BoNT-om događa kroz proces u više koraka koji uključuje svaku od funkcionalnih domena toksina (slika 6). Ovi koraci uključuju vezanje neurotoksina na specifične receptore na presinaptičkom živčanom završetku, endocitozu toksina u živčanu stanicu, translokaciju preko endosomalne membrane i unutarstaničnu aktivnost endopeptidaze u citosolu protiv proteina ključnih za oslobađanje neurotransmitora (Kumar i sur., 2016).



Slika 6. Prikaz vezanja i prometa botulinum toksina unutar živčanih završetaka (preuzeto i prilagođeno prema Rossetto i sur.(2014))

Botulinum toksin ima visok afinitet i specifičnost za svoje ciljane stanice i koristi dva različita koreceptora za vezanje na membranineurona. Prvi korak u intoksikaciji uključuje vezanje karboksi-terminalnog kraja HC domene (vežuća HC-C domena) na polisialogangliozidni (PSG) akceptor koji je prisutan na presinaptičkoj membrani. Nakon vezanja na gangliozide, membranski vezan kompleks gangliozid-toksin pomiče se kako bi dosegao drugi akceptor, SV2, glikoprotein sinaptičkih vezikula, ili sinaptotagmin, protein sinaptičkih vezikula. BoNT zatim endocitozom ulazi u presinaptičku stanicu, zbog acidifikacije vezikule djelovanjem protonске pumpe, BoNT postaje protoniran i dolazi do konformacijske promjene u strukturi neurotoksina, što rezultira odvajanjem kratkog od dugog lanca i translokacije L lanca (katalitičke domene) preko membrane endosomau citosol. Zahvaljujući djelovanju sustava tioredoksin reduktaza-tioredoksin (TrxR–Trx) cijepa se disulfidna veza (S-S) između lakog lanca (LC) i translokacijske domene (HN domene) teškog lanca. Nakon translokacije u neuronski citosol, botulinum toksin ispoljava svoj toksični učinak zahvaljujući metaloproteaznoj aktivnosti katalitičke domene, koja specifično cijepa jedan od tri SNARE proteina koji su sastavni dio sustava regulacije vezikularnog prometa i egzocitoze neurotransmitora. Specifični ciljni proteini iz SNARE kompleksa i mjesto

hidrolitičkog cijepanja određenih proteinskih meta razlikuju se između sedam BoNT serotipova. BoNT serotipovi A i E specifično cijepaju SNAP-25 na jedinstvenoj peptidnoj vezi, BoNT serotipovi B, D, F i G hidroliziraju VAMP/sinaptobrevin, na različitim pojedinačnim peptidnim vezama, a BoNT/C cijepa i sintaksin i SNAP-25 (Kukreja i Singh, 2015; Rossetto i sur., 2014).

Toksično djelovanje botulinum toksina na živčane završetkeje potpuno reverzibilno i ne dovodi do neurodegeneracije. Tijekom intoksikacije BoNT-om, za razliku od denervacije, održava se kontakt između živčanog završetka i mišićnog vlakna bez gubitka motornih neurona. Histološke studije pokazale su da se proces oporavka odvija u dvije faze. Nakon sinaptičke blokade kolinergičkih živčanih završetaka, neuron formira nove sinapse koje zamjenjuju njegove izvorne u procesu poznatom kao klijanje. Dolazi do razvoja novih sinapsi s povećanom stopom recikliranja vezikula. U drugoj fazi živčani završeci se oporavljaju, originalne sinapse se regeneriraju, klice se povlače i funkcionalnost se vraća u normalu. Vrijeme oporavka ovisi o serotipovima i mjestu intoksikacije (Kukreja i Singh, 2015; Kumar i sur., 2016).

1.2.3. Klinička primjena botulinum toksina tipa A

Početakom 20. stoljeća uočeno je da se ubrizgavanjem botulinum toksina može postići lokalizirana paraliza pojedinih mišićnih skupina bez izazivanja botulizma (Turton i sur., 2002). 1981. godine prepoznat je terapijski potencijal botulinum toksina tipa A nakon primjene niskih doza u očne mišiće za ispravljanje strabizma, te ga je iste godine Američka Agencija za hranu i lijekove (engl. *U.S. Food and Drug Administration*, FDA), nakon opsežnog laboratorijskog i kliničkog ispitivanja, odobrila kod pacijenata sa strabizmom, blefarospazmom i drugim poremećajima facijalnog živca, uključujući hemifacijalni spazam. Godine 2000. FDA je odobrila BoNT/A za cervikalnu distoniju i kod glabelarnih bora u kozmetičke svrhe. Tijekom godina, broj terapijskih indikacija u kojima se za liječenje koristi botulinum toksin samo je rastao, te on danas uključuje liječenje preaktivnog mokraćnog mjehura (neurogeni i idiopatski), kronične migrene, dječje cerebralne paralize, spastičnosti gornjih udova i aksilarnu hiperhidrozu. Također se koristi 'off label' za liječenje raznih kroničnih bolnih stanja koja uključuju kroničnu bol u donjem dijelu leđa, te neuropatke boli različite etiologije (Bomba-Warczak i sur., 2016).

Izvanredna terapijska korist botulinum toksina leži u njegovoj sposobnosti da specifično i snažno inhibira hiperaktivnost mišića tijekom duljžeg razdoblja (3-6 mjeseci). Ovisno o ciljnom tkivu, BoNT može blokirati kolinergičku autonomnu inervaciju suznih, žlijezda slinovnica i znojnica ili kolinergičku neuromuskularnu inervaciju poprečno-prugastih i glatkih mišića. Nakon intramuskularne injekcije, paralitički učinak BoNT-a ovisan o dozi može se vidjeti unutar 2–3 dana, a svoj maksimalni učinak postiže za 2 tjedna. Intoksikacija živčanog završetka BoNT-om potpuno je reverzibilna, djelovanje postupno počinje slabiti za nekoliko mjeseci i ne dovodi do neurodegeneracije. Nema dokaza o bilo kakvoj dugotrajnoj ili trajnoj degeneraciji ili atrofiji mišića kod pacijenata s ponavljanim injekcijama BoNT-a tijekom produljenog razdoblja (Kukreja i Singh, 2015).

Samo su botulinum toksin tipa A i B razvijeni za komercijalnu upotrebu u rutinskoj kliničkoj praksi. Registrirani i na tržištu dostupni pripravci bazirani na BoNT/A su onabotulinumtoxin A (Botox® , Botox Cosmetic®), abobotulinumtoxin A (Dysport®) i incobotulinumtoxin A (Xeomin®), dok je BoNT/B komercijalno dostupan kao rimabotulinumtoxin B (Myobloc® /NeuroBloc®) (Dressler, 2019; Bomba-Warczak i sur., 2016). FDA je 2022. odobrila registraciju novog oblika BoNT/A, daxibotulinumtoxin A (Daxxify®) čije je djelovanje duže u usporedbi s prijašnjim pripravcima (Solish i sur., 2021). Jačina komercijalno dostupnog proizvoda izražava se u internacionalnim jedinicama (i.j.) pri čemu jedna jedinica odgovara količini toksina koja nakon intraperitonealne primjene uzrokuje smrt 50% miševa (LD50). Brojni čimbenici utječu na kliničku snagu pripravaka, stoga jedinice nisu niti klinički ekvivalentne niti su međusobno zamjenjive između proizvoda (Wheeler i Smith, 2013).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Premda se više od 30 godina primjenjuje u kliničkoj praksi, molekularni mehanizam djelovanja botulinum toksina i dalje je predmet istraživanja. Posebno se to odnosi na djelovanje toksina na senzorne neurone, budući da u brojnim animalnim modelima boli, kao i u kliničkim studijama pokazuje dugotrajno smanjenje bolne hiperosjetljivosti nakon jednokratne primjene u mišić ili kožu.

Na koji način botulinum toksin interferira s putovima nocicepcije, s kojim sustavima/stanicama ulazi u interakcije te može li putovati duž i između neurona neka su od pitanja važna za istraživače.

Nije poznato može li se botulinum toksin distribuirati u središnjem živčanom sustavu, te koje su moguće posljedice toga.

Stoga je cilj ovog diplomskog rada bio ispitati distribuciju botulinum toksina u različitim regijama mozga nakon primjene u moždane komore, odnosno cisternu magnu. Ovo je istraživanje dio većeg istraživanja mehanizma djelovanja botulinum toksina na bol.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Tkivo životinje

Za potrebe ovog diplomskog rada, analizirani su uzorci poprečnih prereza mozga prikupljenih od mužjaka štakora soja Wistar u dobi od 3 mjeseca, težine od 300 do 400 g, uzgojenih u nastambi za životinje Zavoda za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Ukupno je u pokusu korišteno 36 životinja, od kojih je 24 testirano na modelu boli i kasnije žrtvovano za imunohistokemijsku analizu; a 12 ih je žrtvovano samo za imunohistokemijsku analizu. Životinje su držane u skupinama od tri po kavezu na 12-satnom ciklusu svjetlo/tama sa slobodnim pristupom hrani i vodi prije pokusa. Životinje su nasumično raspoređene u eksperimentalne skupine. Eksperimentator nije bio svjestan tretmana životinja. Briga o životinjama i eksperimentalni postupci bili su u skladu s aktualim propisima i Zakonom o zaštiti životinja. Pokuse je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Pokuse na životinjama, od bihevioralnih mjerenja do žrtvovanja, provodile su samo one osobe koje su ovlaštene za rad s eksperimentalnim životinjama, odnosno koje imaju licencu od nadležnog tijela.

3.2. Ispitivana tvar – botulinum toksin tipa A

U pokusu je korišten botulinum toksin tipa A (Botox®, Allergan, SAD). Bočica Botox®-a sadrži 100 i.j. pročišćenog liofilizata toksina tipa A *Clostridium botulinum* bakterije. Jedna internacionalna jedinica odgovara količini toksina koja nakon i.p. primjene uzrokuje smrt 50% miševa ($LD_{50} = 0,048 \text{ ng} = 1 \text{ i.j.}$). BoNT/A pripremljen je otapanjem u fiziološkoj otopini (0.9% NaCl) i primijenjen intracisternalno (IC) u dozi od 1 i.j./kg i volumenu od 10 μL . Intracisternalna primjena izvršena je između zatiljnog grebena (protuberantia occipitalis) i atlasa direktno kroz kožu i tvrdu moždanu ovojnicu (dura mater) u cisternu magnu (Nirogi i sur., 2009.) na anesteziranim životinjama, a ispravnost primjene provjerena je ekstrakcijom male količine likvora prilikom primjene. Za primjenu su korištene inzulinske šprice s neodvojivimiglama promjera 27½ G i volumena 0,5 mL (Terumo Europe NV, Leuven, Belgija).

3.3. Eksperimentalni protokol

Štakorima je 5 dana prije izvođenja formalinskog testa (rezultati nisu dio ovog diplomskog rada) i imunohistokemijske analize injiciran BoNT/A intracisternalno. Dva sata nakon primjene formalina, štakori su anestetizirani kloralhidratom (300 mg/kg) te su podvrgnuti transkardijalnoj perfuziji s paraformaldehidom radi uzimanja tkiva mozga za pripremu uzoraka potrebnih za imunohistokemijsku analizu. U pokus je bila uključena i kontrolna skupina životinja, kojoj je umjesto BoNT/A injicirana fiziološka otopina.

3.3.1. Priprema tkiva za imunohistokemijsku analizu

Prikupljeni uzorci mozga za imunohistokemijsku analizu su čuvani na temperaturi od 4°C preko noći u 10%-tnoj otopini sukroze u paraformaldehidu, te potom idući dan u 30 %-tnoj otopini sukroze u fosfatnom puferu (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS). Naposljetku, uzorci su smrznuti na -80 °C u tekućem dušiku i pohranjeni do uporabe. Smrznuti su uzorci izrezani na kriostatu (Leica, Germany) na prereze debljine 40 µm.

3.3.2. Kemikalije

Za imunohistokemijsku analizu korištene su sljedeće kemikalije: Alexa Fluor™ 488 Tyramide SuperBoost™ Kit, goat anti-rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) koji sadrži: pufer za blokiranje (10% kozji serum), poli-HRP-konjugirano sekundarno protutijelo, Alexa Fluor™ tiramidni reagens, stabilizirana otopina 3% vodikovog peroksida, reakcijski pufer, reagens za zaustavljanje reakcije i dimetilsulfoksid (DMSO). Za pripremu fiziološke otopine puferirane PBS-om fosfatnim puferom korišteni su natrijev klorid (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska), kalij klorid (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska), kalij hidrogenfosfat (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska), dinatrijev hidrogen fosfat (Carlo Erba Reagents, Cornaredo MI, Italija). Još su korišteni Triton X-100 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), anti-BT-A-cijepano SNAP-25 (cISNAP-25) zečje poliklonsko protutijelo (poklonila Ornella Rossetto, Sveučilište u Padovi, Italija) i Flouorshield™ with DAPI (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA).

3.3.3. Imunohistokemija

Uzorci za analizu su stavljeni u jažice i isprani 3 puta s otopinom PBS-a u volumenu od 500 μ L po 5 minuta. U svaku jažicu je stavljeno 4 kapi vodikovog peroksida i stavljeno na inkubaciju sat vremena, te potom isprano 3 puta otopinom PBS-Tritona X 0,25% (PBS-T) po 5 minuta. Nakon ispiranja, potrebno je maknuti PBS-T, dodati 2-3 kapi pufera za blokiranje (10% kozjeg seruma) i ponovno inkubirati sat vremena. Nakon inkubacije, potrebno je ukloniti pufer za blokiranje i staviti 200 μ L primarnog protutijela za pocijepani SNAP-25, te smjesu ostaviti na inkubaciji preko noći. Idući dan nakon provedene inkubacije, treba ukloniti primarno protutijelo, isprati 3 puta uzorke otopinom PBS-T te nakon ispiranja dodati poli-HRP-konjugirano sekundarno protutijelo. Uzorci se ostave na inkubaciji sa sekundarnim protutijelom sat vremena, nakon isteka vremena se ispiru 3 puta otopinom PBS-T, te potom im se doda otopina tiramidnog reagensa. Otopinu tiramidnog reagensa potrebno je pripremiti miješanjem 1 dijela tiramidnog reagensa, 1 dijela otopine vodikovog peroksida i 100 dijelova 5% otopine reakcijskog pufera. Nakon što je reagens stajao maksimalno 10 minuta, potrebno ga je ukloniti iz jažica i dodati reagens za zaustavljanje reakcije. Posljednji put se uzorci ispiru 3 puta otopinom PBS-T, te se potom se nanose na predmetna stakalca. Prije stavljanja pokrovnog stakalca, na uzorke se stavlja Fluoroshield+DAPI medij koji služi za dugotrajno očuvanje uzoraka. Prerezi su vizualizirani fluorescentnim mikroskopom (Olympus BX51, Olympus, 22 Tokyo, Japan) spojenim na digitalnu kameru (Olympus DP-70, Olympus, Tokyo, Japan) i fotografirani na 4x i 20x povećanju.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Za potrebe ovog diplomskog rada provedena je analiza pocijepanog SNAP-25 proteina u prerezima mozga štakora nakon intracisternalne primjene botulinum toksina tipa A imunohistokemijskom metodom. Pocijepani SNAP-25 je produkt enzimske aktivnosti BoNT/A, te služi kao posredni pokazatelj (biomarker) prisutnosti toksina u promatranim uzorcima. Budući da BoNT/A enzimski cijepa jedino SNAP-25, to se njegov fragment može smatrati relevantnim pokazateljem prisutnosti proteolitički aktivnog toksina u promatranim strukturama/tkivima (Matak i sur., 2019).

O sudbini BoNT/A nakon primjene na različita mjesta (primjerice, u mišić, pod kožu, u spinalni kanal) ne zna se dovoljno. Neka su istraživanja pokazala da se nakon lokalne primjene toksina pocijepani SNAP-25 može detektirati u udaljenim područjima. Tako je pokazano da nakon primjene u plantarnu površinu stražnje šape, BoNT/A retrogradnim aksonalnim transportom dolazi u kralješničku moždinu (Matak i sur., 2019). Međutim, nije jasno ostaje li BoNT/A u središnjem ogranku perifernog neurona ili transsinaptički prelazi u druge stanice. Potencijalna transcitoza BoNT/A otvorila bi brojna pitanja od interesa i za bazične istraživače, poput mehanizama transcitoze, potencijalne selektivnosti toksina za određene tipove neurona i stanica, i sl., ali bi također dovela u pitanje i sigurnost kliničke primjene BoNT/A.

Stoga se u ovom radu niska doza BoNT/A (5 i.j./kg) primijenila ciljano u cisternu magnu kako bi se ispitala moguća distribucija toksina u bliža i udaljenija područja unutar središnjeg živčanog sustava. Na bazi mozga, kao i u području moždanih pukotina, odnosno fisura, nalaze se jastučasta proširenja subarahnoidnog prostora označena kao *cisternae subarachnoidales*. Najveća cisterna smještena ispod *arachnoideae mater* leži u prostoru između produžene moždine i donje strane malog mozga. To je cisterna *cerebellomedullaris posterior*, nazvana nekada cisterna magna. Nakon injiciranja u cisternu magnu, BoNT/A ulazi u cerebrospinalnu tekućinu koja cirkulira te se putem nje moguće distribuirati po središnjem živčanom sustavu.

Područja na kojima je ispitana prisutnost pocijepanog SNAP-25 proteina metodom imunohistokemije prikazana su na slici 7, 8 i 9, a uključuju hipokampus, hipotalamus, talamus, sivu tvar oko akvedukta i trigeminalnu kaudalnu jezgru. Prisutnost pocijepanog proteina SNAP-25, vidljiva kao izolirana zeleno-fluorescentna vlakna, najviše je primjećena u području trigeminalnog *nucleus caudalis* (TNC) i u području hipokampusa (HPC), dok je

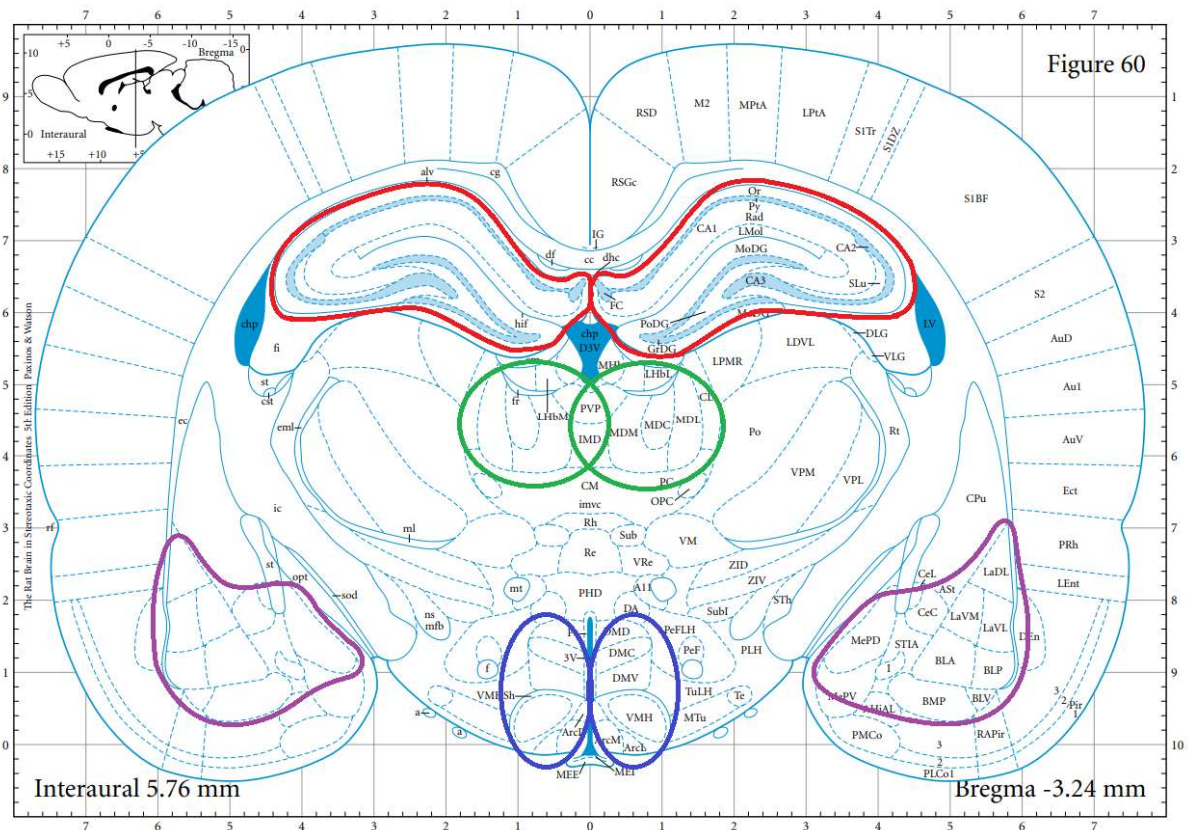
slabije bila zastupljena u području hipotalamusa (HPT) i sive tvari oko akvedukta (engl. *periaqueductal grey*, PAG). Rezultati procjene intenziteta i prisutnosti signala u različitim dijelovima mozga prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Prikaz rezultata kvalitativne analize dobivenih imunohistokemijskom metodom (broj pluseva pokazuje intenzitet signala u pojedinoj regiji)

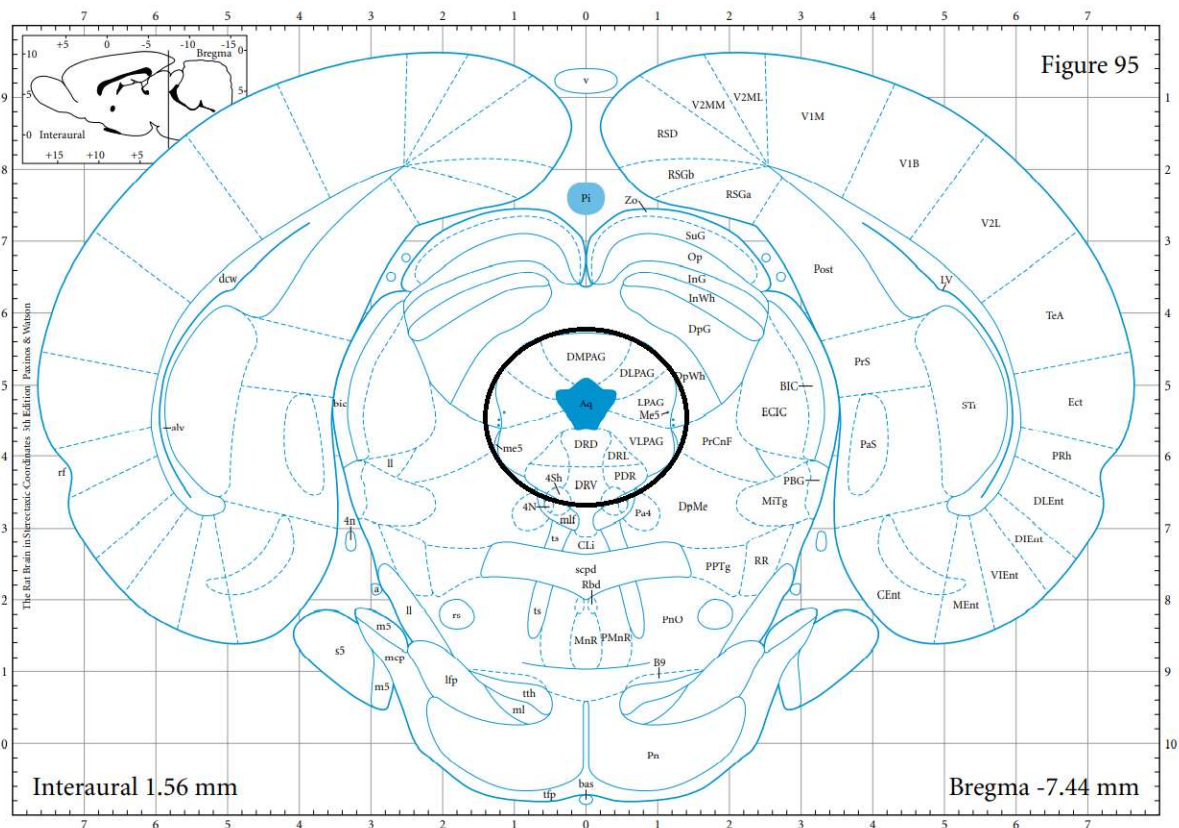
Regijamozga	IC primjenaBoNT-A
TNC	+++++
LC	+
PAG	++
HPC	++++
THAL	-
HPT	+++
AMG	+++

Kratice: TNC = trigeminal nucleus caudalis; LC = locus coeruleus; PAG = periaqueductal gray; HPC = hippocampus; THAL = thalamus; HPT = hypothalamus; AMG = amygdala

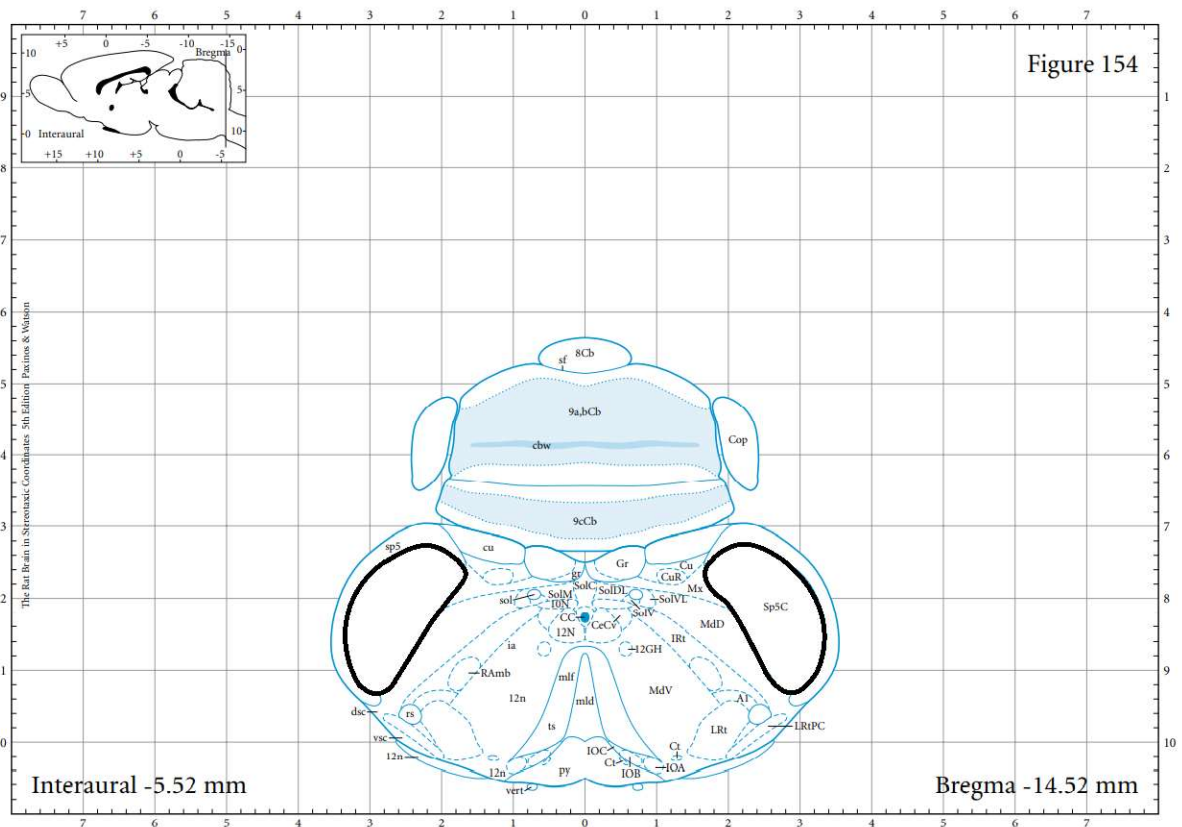
Legenda: - bez signala; + slab signal; ++ srednje jaki signal; +++jaki signal; ++++vrlo jaki signal



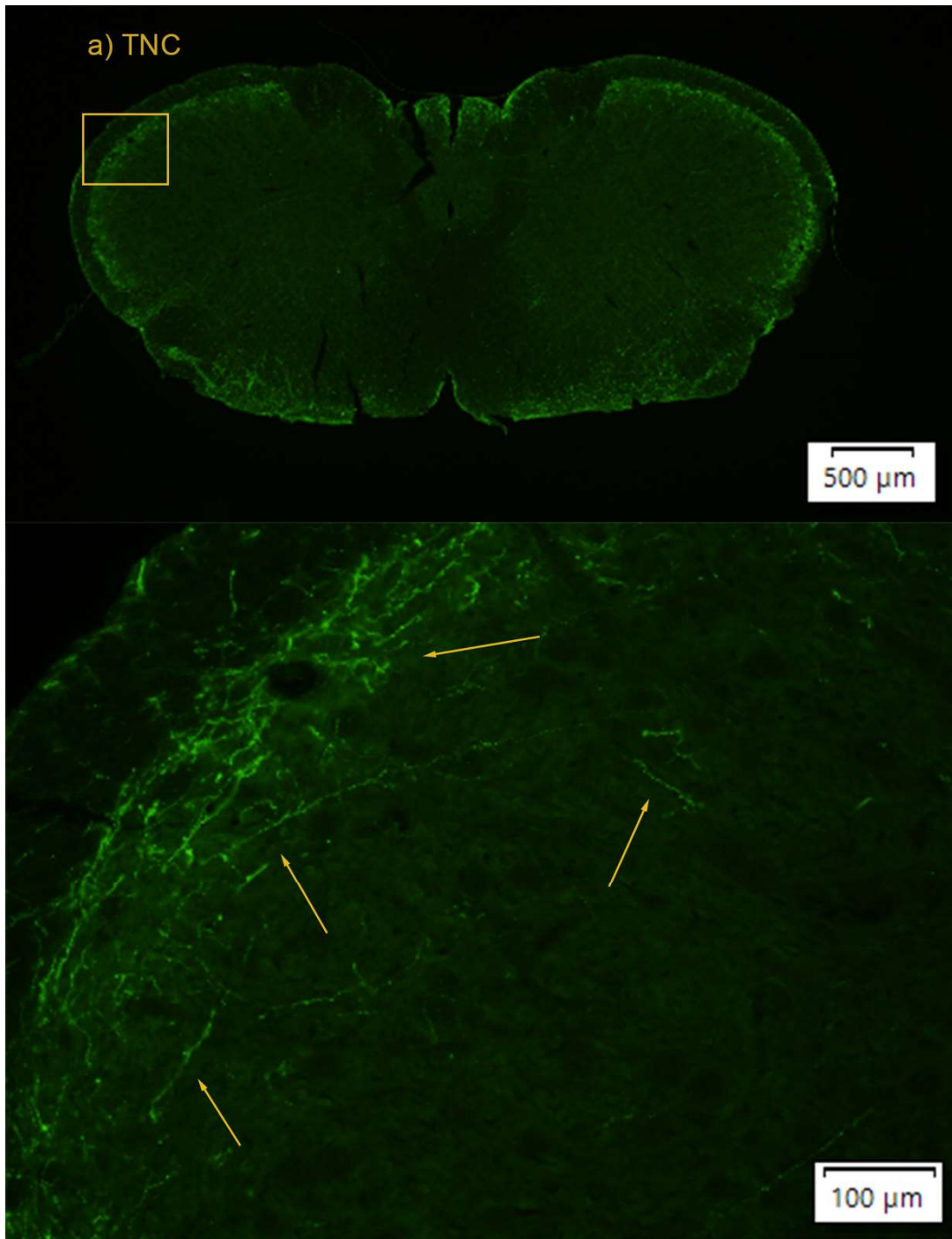
Slika 7. Shematski prikaz poprečnog prereza mozga štakora koji obuhvaća hipokampus (HPC, crveno), talamus (THAL, zeleno), hipotalamus (HPT, plavo) i amigdal (AMG, ljubičasto) (Paxinos i Watson, 2004) Kratice: Or=oriens sloj hipokampusa; Py=piramidni sloj stanica hipokampusa; Rad=sloj radijatuma hipokampusa; LMol= lacunosum molekularni sloj hipokampusa; MoDG=molekularni sloj dentate gyrus; PoDG=polimorfni sloj dentate gyrus; SLU=stratum lucidum hipokampusa; GrDG=granularni sloj dentate gyrus; DMD=dorzalni dio dorzomedijalne jezgre hipotalamusa; DMC=kompaktni dio dorzomedijalne jezgre hipotalamusa; DMV=ventralni dio dorzomedijalne jezgre hipotalamusa; VMH= ventromedijalne hipotalamičke jezgre; ArcD= dorzalni dio lučne jezgre hipotalamusa; ArcM= medijalni dio lučne jezgre hipotalamusa; ArcL= lateralni dio arkuatnog hipotalamičkog nukleusa; VMHSh=entromedijalna jezgra ljuske hipotalamusa



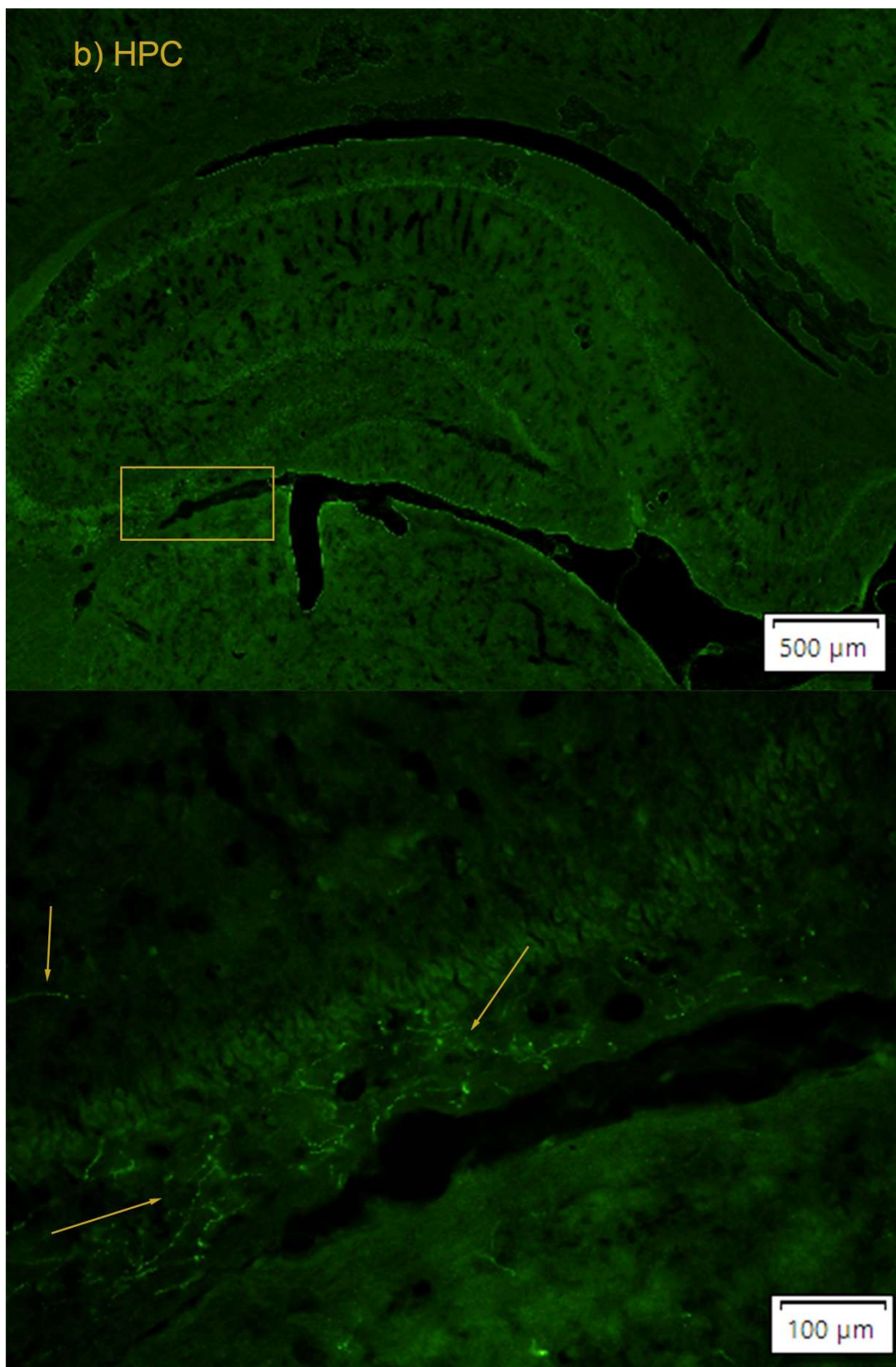
Slika 8. Shematski prikaz poprečnog prereza mozga štakora koji obuhvaća sivu tvar oko akvedukta (PAG) (Paxinos i Watson, 2004) Kratice: DMPAG=dorzomedijalni dio sive tvari oko akvedukta; DLPAG=dorzolateralni dio sive tvari oko akvedukta; LPAG=lateralni dio sive tvari oko akvedukta; VLPAG=ventrolateralni dio sive tvari oko akvedukta; DRD=dorzalni dio dorzalne jezgre rafe; DRV=ventralni dio dorzalne jezgre rafe; DRL=lateralni dio dorzalne jezgre rafe; PDR=posterodorzalna jezgra rafe; Aq=akvedukt



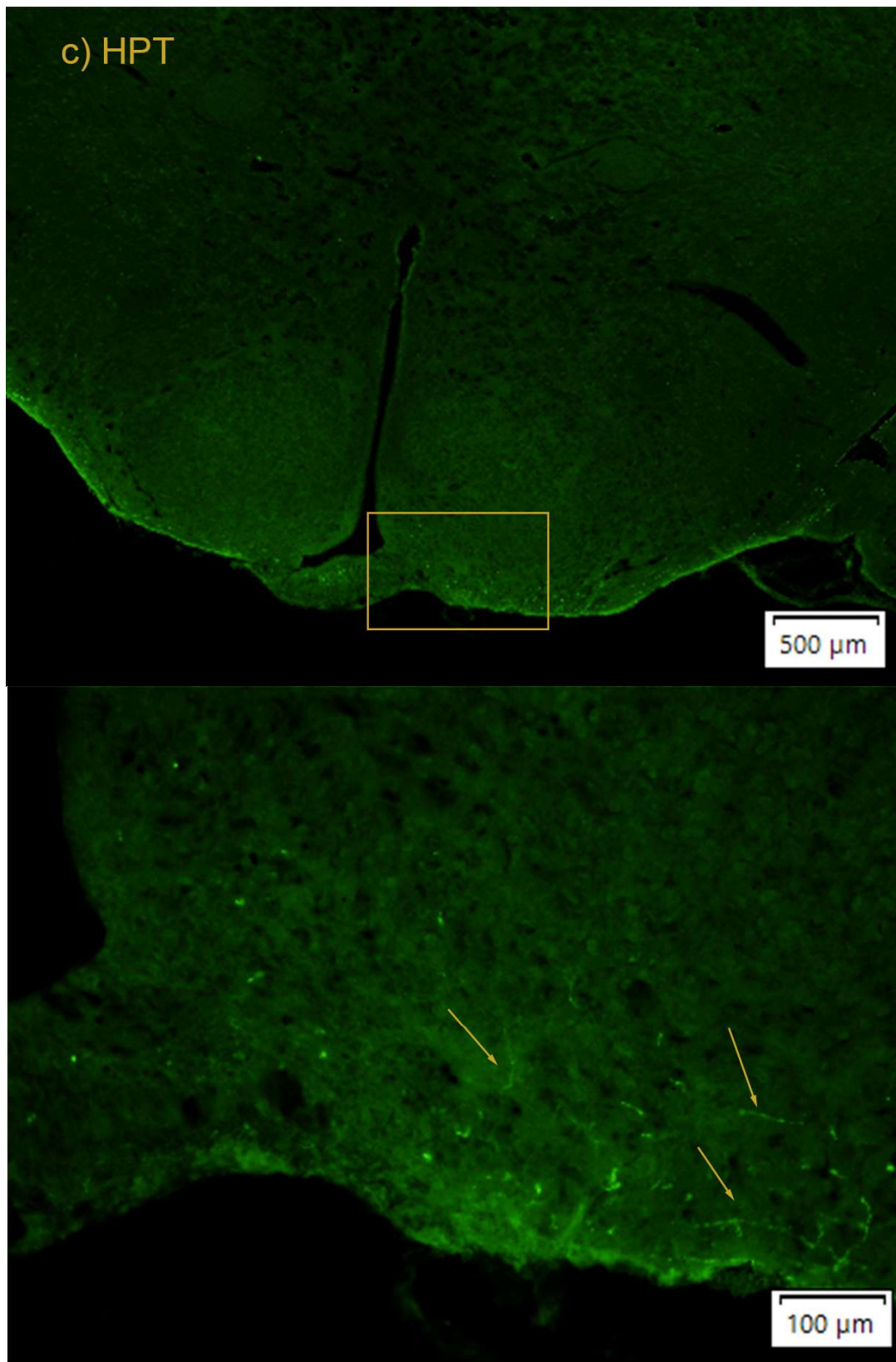
Slika 9. Shematski prikaz poprečnog prereza mozga štakora koji obuhvaća trigeminalni nucleus caudalis (TNC) (Paxinos i Watson, 2004) Kratice: Sp5C=kaudalni dio spinalne trigeminalne jezgre



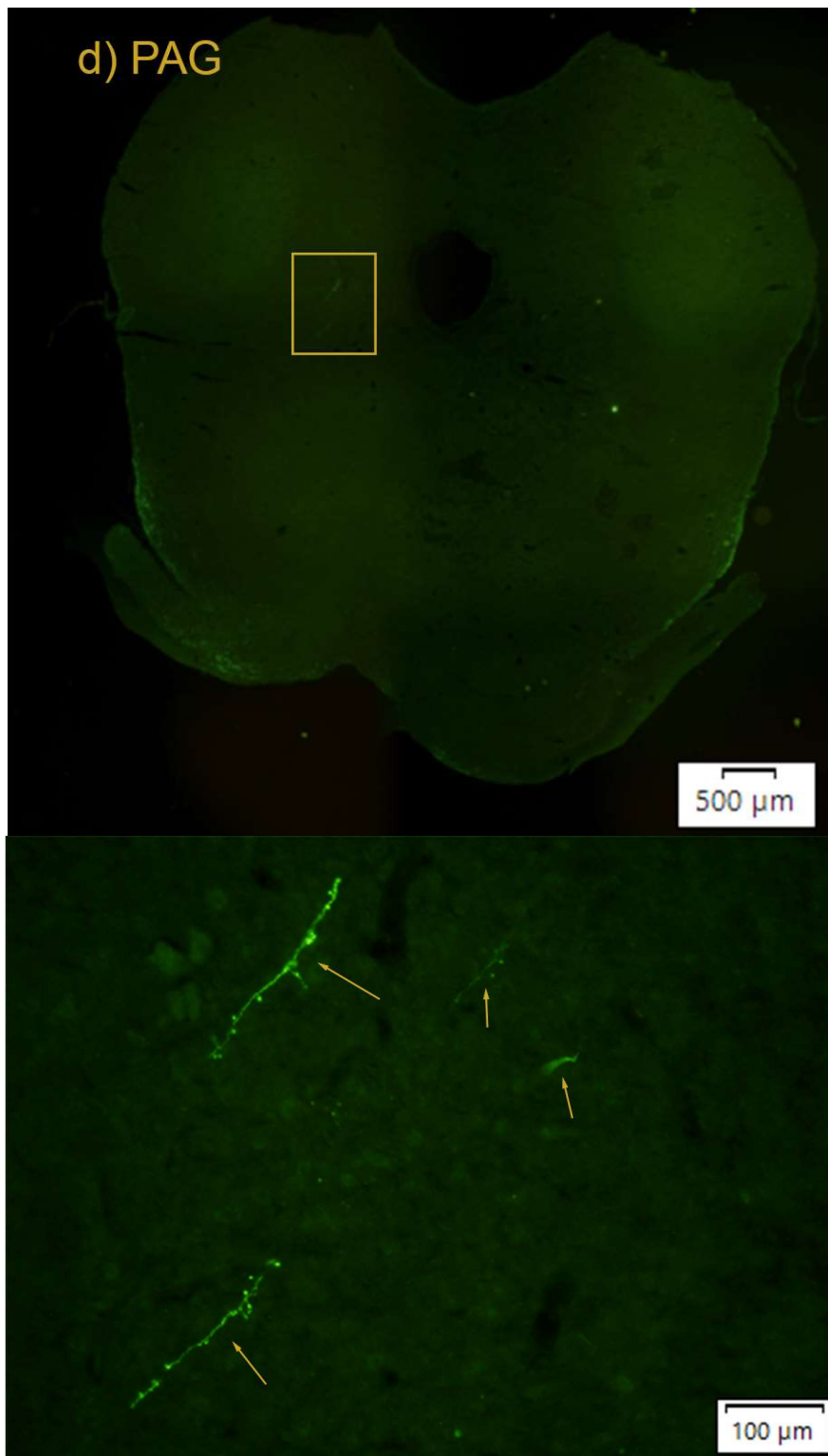
Slika 10. Prikaz imunoreaktivnosti pocijepanog SNAP-25 u trigeminalnom nucleus caudalisu (TNC) nakon intracisternalne primjene BoNT/A, slikane pod povećanjem od 4x (A) i 20x (B)



Slika 11. Prikaz imunoreaktivnosti pocijepanog SNAP-25 u hipokampusu (HPC) nakon intracisternalne primjene BoNT/A, slikane pod povećanjem od 4x (A) i 20x (B)



Slika 12. Prikaz imunoreaktivnosti pocijepanog SNAP-25 u hipotalamusu (HPT) nakon intracisternalne primjene BoNT/A, slikane pod povećanjem od 4x (A) i 20x (B)



Slika 13. Prikaz imunoreaktivnosti pocijepanog SNAP-25 u sivoj tvari oko akvedukta (engl. *periaqueductal grey*, PAG) nakon intracisternalne primjene BoNT/A, slikane pod povećanjem od 4x (A) i 20x (B)

Detekcija enzimske aktivnosti BoNT/A u različitim regijama mozga nakon primjene u cisternu magnu (Slika 10-13) govori u prilog distribucije toksina, ne samo u regije koje su u neposrednoj blizini injiciranja (TNC, hipokampus), već i u udaljenija područja. Na koji način BoNT/A dolazi u područja koja nisu u neposrednoj blizini mjesta injiciranja, odnosno uključuju li to putovanje duž neurona i transinaptički transport, potrebno je utvrditi daljnim eksperimentima.

5. ZAKLJUČAK

Premda se više od 30 godina primjenjuje u kliničkoj praksi, molekularni mehanizam djelovanja botulinum toksina i dalje je predmet istraživanja. Djelovanje na bolnu hiperosjetljivost posebno je interesantno budući da je jedini lijek koji nakon jednokratne primjene ostvaruju učinak koji traje nekoliko mjeseci.

Na koji način botulinum toksin interferira s putovima nocicepcije, s kojim sustavima/stanicama ulazi u interakcije te može li putovati duž i između neurona u udaljenija područja od mjesta injiciranja neka su od pitanja važna za istraživače.

Stoga je cilj ovog diplomskog rada bio ispitati distribuciju botulinum toksina u različitim regijama mozga nakon primjene u cisternu magnu odraslih štakora metodom imunohistokemije.

Pocijepani protein SNAP-25 kao produkt enzimske aktivnosti BoNT/A služi kao pokazatelj prisutnosti toksina u proučavanim tkivima. U ovom je istraživanju prisutnost pocijepanog SNAP-25 proteina detektirana je ne samo u neposrednoj prisutnosti mjesta iniciranja (cisterna magna), već i u udaljenijim područjima sive tvari oko akvedukta (PAG), hipotalamusa, amigdale, te nešto slabije u području locusa coeruleusa.

Rezultatima ovog rada pokazano je kako BoNT/A putuje u udaljena tkiva od mjesta iniciranja, iako mehanizam kojim to čini i dalje ostaje nerazjašnjen te predstavlja daljnji izazov za znanstvenike.

6. LITERATURA

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

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), 183-91.

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

Bouhassira D. Neuropathic pain: Definition, assessment and epidemiology. *Rev Neurol (Paris)* 2019,175(1-2),16-25.

Bullock S., Hales M.(2013). Principles of Pathophysiology, Pearson Australia str. 248-251.

Cohen SP, Vase L, Hooten W M. Chronic pain: an update on burden, best practices, and new advances. *The Lancet*, 2021, 397(10289), 2082–97.

Dressler D, Johnson EA. Botulinum toxin therapy: past, present and future developments. *J Neural Transm (Vienna)*, 2022, 129(5-6), 829-33.

Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2012, str 546-590.

International Association for the Study of Pain. IASP taxonomy, 2012, <https://www.iasp-pain.org/>, pristupljeno 9.9.2022

Jabbari B. Botulinum Toxin Treatment of Pain Disorders, New York, Springer, 2015, str. 2-13.

Jin Y, Takegahara Y, Sugawara Y, Matsumura T, Fujinaga Y. Disruption of the epithelial barrier by botulinum haemagglutinin (HA) proteins - differences in cell tropism and the mechanism of action between HA proteins of types A or B, and HA proteins of type C. *Microbiology (Reading)*, 2009,155(Pt 1),35-45.

Kidd BL, Urban LA. Mechanisms of inflammatory pain. *Br J Anaesth*, 2001, 87(1),3-11.

Kukreja R, Singh BR. The botulinum toxin as a therapeutic agent: molecular and pharmacological insights. *Res Rep Biochemistry*,. 2015,5,173-83.

Kumar R, Dhaliwal HP, Kukreja RV, Singh BR. The Botulinum Toxin as a Therapeutic Agent: Molecular Structure and Mechanism of Action in Motor and Sensory Systems. *Semin Neurol*. 2016 Feb;36(1):10-9.

Luvisetto S. Botulinum Neurotoxins in Central Nervous System: An Overview from Animal Models to Human Therapy. *Toxins (Basel)*, 2021,13(11),751.

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

Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*, 1999, 57(1),1-64.

Nirogi R, Kandikere V, Mudigonda K, Bhyrapuneni G, Muddana N, Saralaya R, Benade V. A simple and rapid method to collect the cerebrospinal fluid of rats and its application for the assessment of drug penetration into the central nervous system. *J Neurosci Methods*, 2009, 178(1), 116-9.

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

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

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

Rossetto O, Pirazzini M, Montecucco C. Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol*, 2014,12(8),535-49.

Said S, Meshkinpour A, Carruthers A, Carruthers J. Botulinum toxin A: its expanding role in dermatology and esthetics. *Am J Clin Dermatol*, 2003,4(9),609-16.

Solish N, Carruthers J, Kaufman J, Rubio RG, Gross TM, Gallagher CJ. Overview of DaxibotulinumtoxinA for Injection: A Novel Formulation of Botulinum Toxin Type A. *Drugs*, 2021,81(18),2091-101.

Timbrell JA. Principles of Biochemical Toxicology. New York, Informa Healthcare USA, 2009, str. 352-4.

Turton K, Chaddock JA, Acharya KR. Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. *Trends Biochem Sci*,2002,27(11),552-8.

Wheeler A, Smith HS. Botulinum toxins: mechanisms of action, antinociception and clinical applications. *Toxicology*, 2013,306,124-46.

Woolf CJ. What is this thing called pain? *J Clin Invest*, 2010, 120(11),3742-4.

Woolf CJ, Costigan M. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999,96(14),7723-30.

7. SAŽETAK

Botulinum toksin tipa A je neurotoksični protein koji proizvodi anaerobna bakterija *Clostridium botulinum*, te predstavlja jedan od najsmrtonosnijih otrova u prirodi. Mehanizam djelovanja BoNT/A uključuje cijepanje proteina SNAP-25 koji ima ključnu ulogu u egzocitozi acetilkolina na krajevima aksona, te posljedično svoje djelovanje manifestira nastankom mlohane paralize mišića. Tijekom godina bazičnih istraživanja, pokazano je da toksin osim na motoričke neurone, također djeluje i na senzorne neurone te tako interferira s prijenosom bolnih signala, što za posljedicu može imati izniman klinički značaj. Kontroliranom primjenom u pikomolarnim dozama toksin se koristi u terapiji stanja koja su uzrokovana hiperaktivnosti mišića, kao što su cervikalna distonija, strabizam, hiperhidroza, ali i u terapiji kroničnih migrena. Brojna istraživanja su rađena istražujući dodatne mogućnosti primjene BoNT/A u kliničke svrhe, između ostalog i u terapiji kronične boli, čije je liječenje do sad predstavljalo veliki izazov.

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati distribuciju botulinum toksina u različitim regijama mozga nakon njegove primjene u cisternu magnu. Eksperimenti su provedeni na mužjacima štakora Wistar na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u skladu s s aktualim propisima i Zakonom o zaštiti životinja. Nakon iniciranja 5 i.j./kg BoNT/A u cisternu magnu, prikupljeni su uzorci tkiva mozgova i pripremljeni za imunohistokemijsku analizu. Pratila se prisutnost pocijepanog SNAP-25 proteina kao pokazatelja prisutnost toksina, u različitim regijama mozga. Dobiveni rezultati ukazuju na prisutnost toksina u neposrednoj blizini mjesta iniciranja, u područjima trigeminalnog nucleus caudalis i hipokampusa, ali i u udaljenim regijama mozga. Ovi nalazi zahtjevaju daljnja istraživanja kako bi se objasnili načini distribucije toksina u udaljenija područja te njihovo značenje za djelovanje toksina, posebice u kliničkom okruženju.

SUMMARY

Botulinum toxin type A is a neurotoxic protein produced by the anaerobic bacterium *Clostridium botulinum*, and is one of the deadliest poisons in nature. The mechanism of action of BoNT/A involves the cleavage of the SNAP-25 protein, which plays a key role in the exocytosis of acetylcholine at the ends of axons, and consequently manifests its action in the occurrence of flaccid muscle paralysis. During the years of basic research, it was shown that the toxin not only acts on motor neurons, but also on sensory neurons and thus interferes with the transmission of pain signals, which as a result can have exceptional clinical significance. With controlled application in picomolar doses, the toxin is used in the treatment of conditions caused by muscle hyperactivity, such as cervical dystonia, strabismus, hyperhidrosis, but also in the treatment of chronic migraines. Numerous studies have been conducted investigating the additional possibilities of using BoNT/A for clinical purposes, among others in the therapy of chronic pain, the treatment of which has been a great challenge so far.

The aim of this thesis was to examine the distribution of botulinum toxin in different regions of the brain after its application to the cisterna magna. The experiments were conducted on male Wistar rats at the Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Zagreb, in accordance with current regulations and the Animal Protection Act. After the initiation of 5 IU/kg BoNT/A into the cisterna magna, brain tissue samples were collected and prepared for immunohistochemical analysis. The presence of cleaved SNAP-25 protein was monitored as an indicator of the presence of toxins in different regions of the brain. The obtained results indicate the presence of toxins in the immediate vicinity of the initiation site, in the areas of the trigeminal nucleus of the caudalis and hippocampus, but also in distant regions of the brain. These findings require further research to explain the ways of toxin distribution to more distant areas and their significance for the action of the toxin, especially in the clinical setting.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

DISTRIBUCIJA BOTULINUM TOKSINA U SREDIŠNJEM ŽIVČANOM SUSTAVU

Barbara Komar

SAŽETAK

Botulinum toksin tipa A je neurotoksični protein koji proizvodi anaerobna bakterija *Clostridium botulinum*, te predstavlja jedan od najsmrtonosnijih otrova u prirodi. Mehanizam djelovanja BoNT/A uključuje cijepanje proteina SNAP-25 koji ima ključnu ulogu u egzocitozi acetilkolina na krajevima aksona, te posljedično svoje djelovanje manifestira nastankom mlohane paralize mišića. Tijekom godina bazičnih istraživanja, pokazano je da toksin osim na motoričke neurone, također djeluje i na senzorne neurone te tako interferira s prijenosom bolnih signala, što za posljedicu može imati izniman klinički značaj. Kontroliranom primjenom u pikomolarnim dozama toksin se koristi u terapiji stanja koja su uzrokovana hiperaktivnosti mišića, kao što su cervikalna distonija, strabizam, hiperhidroza, ali i u terapiji kroničnih migrena. Brojna istraživanja su rađena istražujući dodatne mogućnosti primjene BoNT/A u kliničke svrhe, između ostalog i u terapiji kronične boli, čije je liječenje do sad predstavljalo veliki izazov. Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati distribuciju botulinum toksina u različitim regijama mozga nakon njegove primjene u cisternu magnu. Eksperimenti su provedeni na mužjacima štakora Wistar na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u skladu s aktualnim propisima i Zakonom o zaštiti životinja. Nakon iniciranja 5 i.j./kg BoNT/A u cisternu magnu, prikupljeni su uzorci tkiva mozga i pripremljeni za imunohistokemijsku analizu. Pratila se prisutnost pocijepanog SNAP-25 proteina kao pokazatelja prisutnosti toksina, u različitim regijama mozga. Dobiveni rezultati ukazuju na prisutnost toksina u neposrednoj blizini mjesta iniciranja, u područjima trigeminalnog nucleus caudalis i hipokampus, ali i u udaljenim regijama mozga. Ovi nalazi zahtijevaju daljnja istraživanja kako bi se objasnili načini distribucije toksina u udaljenija područja te njihovo značenje za djelovanje toksina, posebice u kliničkom okruženju.

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

Rad sadrži: 35 stranica, 13 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 29 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Botulinum toksin, pocijepani SNAP-25 protein, imunohistokemijska analiza, središnji živčani sustav

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

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

Dr. sc. Anita Hafner, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: listopad 2022.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

DISTRIBUTION OF BOTULINUM TOXIN IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

Barbara Komar

SUMMARY

Botulinum toxin type A is a neurotoxic protein produced by the anaerobic bacterium *Clostridium botulinum*, and is one of the deadliest poisons in nature. The mechanism of action of BoNT/A involves the cleavage of the SNAP-25 protein, which plays a key role in the exocytosis of acetylcholine at the ends of axons, and consequently manifests its action in the occurrence of flaccid muscle paralysis. During the years of basic research, it was shown that the toxin not only acts on motor neurons, but also on sensory neurons and thus interferes with the transmission of pain signals, which as a result can have exceptional clinical significance. With controlled application in picomolar doses, the toxin is used in the treatment of conditions caused by muscle hyperactivity, such as cervical dystonia, strabismus, hyperhidrosis, but also in the treatment of chronic migraines. Numerous studies have been conducted investigating the additional possibilities of using BoNT/A for clinical purposes, among others in the therapy of chronic pain, the treatment of which has been a great challenge so far. The aim of this thesis was to examine the distribution of botulinum toxin in different regions of the brain after its application to the cisterna magna. The experiments were conducted on male Wistar rats at the Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Zagreb, in accordance with current regulations and the Animal Protection Act. After the initiation of 5 IU/kg BoNT/A into the cisterna magna, brain tissue samples were collected and prepared for immunohistochemical analysis. The presence of cleaved SNAP-25 protein was monitored as an indicator of the presence of toxins in different regions of the brain. The obtained results indicate the presence of toxins in the immediate vicinity of the initiation site, in the areas of the trigeminal nucleus of the caudalis and hippocampus, but also in distant regions of the brain. These findings require further research to explain the ways of toxin distribution to more distant areas and their significance for the action of the toxin, especially in the clinical setting.

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

Thesis includes: 35 pages, 13 figures, 1 table and 29 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Botulinum toxin, cleaved SNAP-25 protein, immunocytochemical analysis, central nervous system

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
Anita Hafner, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Sandra Šupraha Goreta, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: October 2022.

