Utjecaj botulinum toksina tipa A na aktivaciju neurona u eksperimentalnoj upalnoj boli

Belošević, Karolina

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:379833

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Karolina Belošević

Utjecaj botulinum toksina tipa A na aktivaciju neurona u hipotalamusu u eksperimentalnoj upalnoj boli

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

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

Od srca zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Lidiji Bach-Rojecky na stručnom vodstvu i pomoći tijekom izrade ovog diplomskog rada te osobito na svom prenesenom znanju tijekom studija.

Također se srdačno zahvaljujem dr. sc. Višnji Drinovac Vlah na pomoći pri izvođenju eksperimentalnog dijela rada i obradi dobivenih rezultata.

Najveću zahvalnost izričem svojoj obitelji - roditeljima Dragutinu i Mirjani, sestri Karmen i bratu Davidu na beskrajnoj ljubavi koju mi svakodnevno pružaju, na divnim riječima potpore te što su uz mene u svakom trenutku.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Patofiziologija boli 1
1.1.1. Podjela boli 1
1.1.2. Receptori za bol i signalni putovi u prijenosu bolnog podražaja 3
1.1.3. Neurotransmitori uključeni u nocicepciju 5
1.1.4. Kontrola boli putem descedentnih inhibitornih putova 6
1.2. Uloga hipotalamusa u osjetu boli 8
1.3. Botulinum toksin 11
1.3.1. Struktura botulinum toksina tipa A 11
1.3.2. Mehanizam djelovanja botulinum toksina 12
1.3.3. Klinička primjena botulinum toksina 14
1.3.4. Analgetsko djelovanje BT-A 15
1.4. Neuralni markeri boli: c-Fos i pERK 18
2. OBRAZLOŽENJE TEME 21
3. MATERIJALI I METODE 22
3.1. Tkivo životinje 22
3.2. Ispitivana tvar - botulinum toksin tipa A 22
3.3. Metoda uzrokovanja eksperimentalne upalne boli: formalinski test 23
3.4. Eksperimentalni protokol 23
3.4.1. Priprema uzoraka za imunohistokemijsku analizu 24
3.4.2. Kemikalije 24
3.4.3. Imunohistokemija 24
3.5. Analiza rezultata 25
3.6. Statistička obrada podataka 26
4. REZULTATI I RASPRAVA 27
5. ZAKLJUČAK 33
6. LITERATURA 34
7. SAŽETAK/SUMMARY 39
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

1.1. Patofiziologija boli

Prema Međunarodnom udruženju za istraživanje boli (engl. *Internacional Society for the Study of Pain,* IASP) bol je definirana kao „neugodno osjetno i emocionalno iskustvo povezano sa stvarnim ili mogućim oštećenjem tkiva“. Bol je dakle složeno iskustvo koje se sastoji od dviju komponenanata – opažanja bolnog podražaja i emocionalne reakcije, tj. osjećaja neugode koji prati štetni podražaj, dok nocicepcija uključuje neurofiziološki mehanizam opažanja takvog podražaja. Uloga boli, uz upozoravanje na stvarnu ili moguću ozljedu tkiva, uključuje i upozoravanje na lokalno ili sustavno narušenje homeostaze pa je jedna od uloga nocicepcijskog sustava ponovna uspostava homeostaze koja podrazumijeva aktivaciju endogenih analgetskih putova. Nocicepcijski se signali, u smislu modulacije i inhibicije, obrađuju na različitim razinama živčanog sustava. (Demarin i sur., 2011) Bol je zaštitni mehanizam koji se pojavljuje pri bilo kakvom oštećenju tkiva te potiče reakcije kojima se uklanja bolni podražaj. (Guyton i Hall, 2006)

1.1.1. Podjela boli

Bol možemo klasificirati prema različitim značajkama – prema porijeklu, na temelju trajanja, etiologije ili patofiziologije, prema intenzitetu i simptomima. Prema porijeklu bol može biti kutana, mišićna, visceralna i dr., a prema trajanju se grubo dijeli na akutnu i kroničnu. Prema etiologiji kao najvažnije oblike razlikujemo nociceptivnu, upalnu i neuropatsku bol koje se razlikuju u mehanizmu nastanka, patofiziološkim karakteristikama i trajanju. (Bach-Rojecky, 2006)

Akutna bol nastaje kao posljedica vanjske ili unutarnje ozljede tkiva, može se lokalizirati, a njezin je intenzitet najčešće u korelaciji s intenzitetom uzročnog čimbenika te prestaje sa završetkom procesa cijeljenja. Izrazito je protektivnog karaktera, a ukoliko se neadekvatno liječi, zbog razvoja periferne i centralne senzitizacije, prelazi u kroničnu bol. (Brinar i sur., 2009)

Kronična bol se definira kao bol koja traje 3-6 mjeseci i dulje, postaje zasebna bolest neovisna o uzroku i više nema protektivan karakter te je stoga specifičan terapijski problem.

(Brinar i sur., 2009) Održana je i nakon procesa cijeljenja, a rezultat je trajnog patološkog poremećaja. Osobita značajka kronične boli jest preosjetljivost na uobičajene bolne podražaje (fenomen hiperalgezije), ali i osjetljivost na podražaje koji ne mogu uzrokovati osjet boli (fenomen alodinije). (Puljak i Sapunar, 2014)

Nociceptivna bol je prilagodbena bol koja nastaje podražajem nocireceptora mehaničkom silom, toplinom, hladnoćom ili kemijskim agensima bez popratnog oštećenja tkiva. To je obično upozoravajuća trenutna bol, često povezana s refleksima izbjegavanja. (Gamulin i sur., 2011) Djeluje kao rani sustav upozorenja organizma na moguću ozljedu tkiva. Akutni bolni podražaj aktivira specifične receptore (npr. vaniloidne TRPV1 receptore) ili ionske kanale na perifernim živčanim završetcima C- i Aδ-vlakana. Podražaj TRPV1 receptora dovodi do lokalnog lučenja glutamata iz perifernih okončina, a ako je podražaj dovoljnog intenziteta, luči se i spori neurotransmitor tvar P te se signal preko kralježnične moždine prenosi do viših centara u talamus i somatosenzorički korteks. (Bach-Rojecky, 2006)

Upalna bol je posljedica ozljede tkiva i upala. Po značenju je prilagodbena jer uzrokuje imobilizaciju oštećenog područja i tako omogućuje cijeljenje ozljede, tj. smirivanje upale. Ozljede i upale tkiva uzrokuju značajne kemijske promjene u mikrookolišu nocireceptora. Iz ozlijeđenih stanica oslobađaju se, među ostalim, vodikovi i kalijevi ioni te ATP, a upalne stanice oslobađaju prostaglandine i leukotriene, histamin, bradikinin, citokine i kemokine, čimbenike rasta i dr. Razlikujemo aktivatore (npr. vodikovi ioni, ATP, serotonin) koji, vežući se za odgovarajuće receptore, izravno aktiviraju nocireceptore, te senzibilizatore (npr. prostaglandini) koji različitim mehanizmima smanjuju prag podražljivosti nocireceptora. (Gamulin i sur., 2011) Aktivacijom nocireceptora iz kolateralnih živčanih završetaka istog nocireceptora luče se SP (tvar P) koji dovodi do vazodilatacije te CGRP (engl. *calcitonin gene-related peptide,* polipeptid kalcitoninskog gena) koji povećava kapilarnu permeabilnost. Pri upali dolazi do aktivacije i tzv. tihih („*silent*“) nociceptora (10-20% C-nociceptora u koži koji se ne aktiviraju bolnim podražajima u fiziološkim uvjetima) koji se djelovanjem medijatora upale senzitiziraju i odgovaraju na podražaje niskog i visokog intenziteta termalne, mehaničke i kemijske prirode. Konačno, upalna bol ima karakteristike senzitizacije, hiperalgezije i alodinije. (Bach-Rojecky, 2006)

Neuropatska bol nastaje kao posljedica ozljede ili disfunkcije perifernog i/ili središnjeg živčanog sustava npr. u dijabetesu, kroničnom alkoholizmu, HIV-infekciji, ozljedi kralježnične moždine i sl. Mehanizam nastanka je vrlo složen, a uključuje brojne patološke

promjene na periferiji, tj. mjestu ozljede živca, te na spinalnoj i supraspinalnoj razini. (Bach-Rojecky, 2006) To je tupa bol koja se širi u inervacijskom području zahvaćenih živčanih vlakana, a osjeća se i u odsustvu nocicepcijskog podražaja. (Brinar i sur., 2009)

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

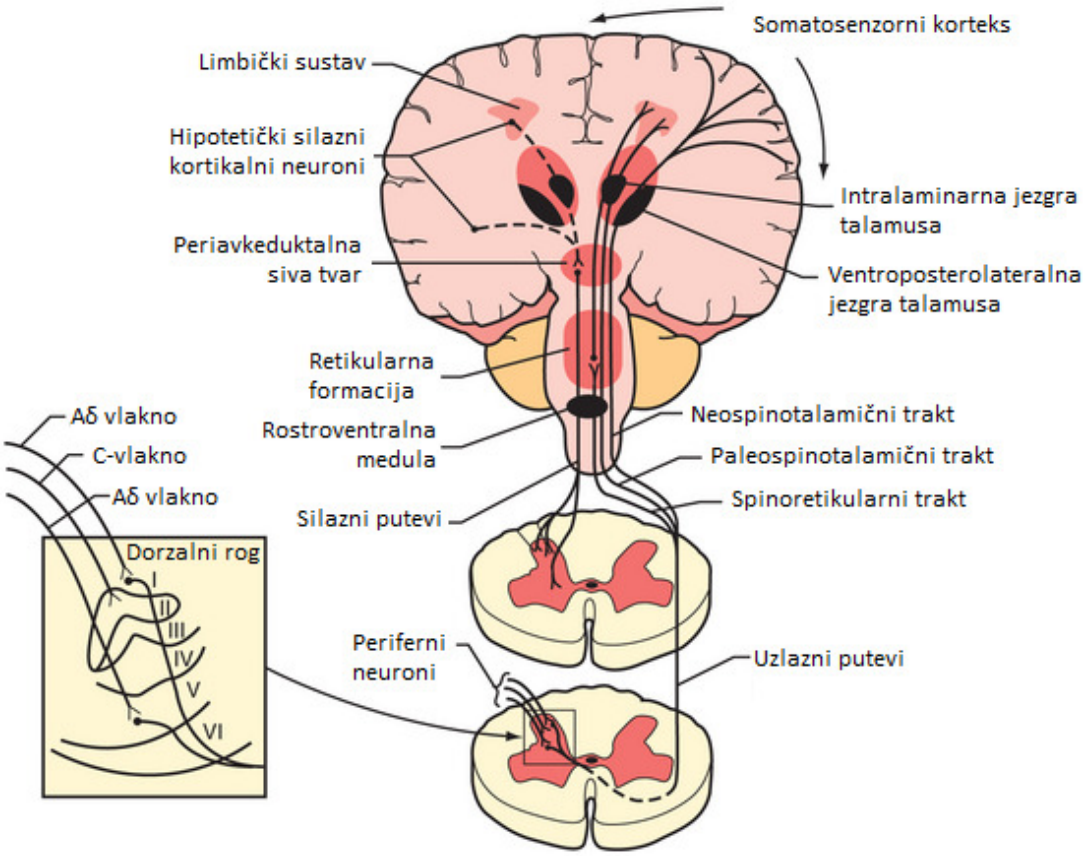
Štetni podražaji kože i potkožnog tkiva, primjerice mišića ili zglobova, pobuđuju nocireceptore, slobodne periferne završetke primarnih osjetnih neurona. Postoje tri glavne vrste nocireceptora: *toplinski i mehanički*, *polimodalni* te *tzv. tihi nocireceptori*. Toplinske nocireceptore podražuju vrlo visoke ili vrlo niske temperature (>45 ili <5 °C), mehaničke nocireceptore podražuje snažan mehanički pritisak, a polimodalne nocireceptore aktiviraju snažni mehanički, kemijski i toplinski podražaji. Podražaje mehaničkih i toplinskih nocireceptora prenose tanka mijelinizirana Aδ-živčana vlakna brzinom od 5 do 30 m/s, dok podražaje polimodalnih nocireceptora prenose nemijelinizirana C-vlakna, brzinom manjom od 1m/s. Ove tri vrste nocireceptora široko su rasprostranjena u koži i potkožnim tkivima te se najčešće aktiviraju istodobno. (Demarin i sur., 2011) Pokazano je da aktivnost Aδ-vlakna izaziva osjet oštre, dobro lokalizirane boli, dok aktivnost C-vlakna izaziva tupu, žareću bol. (Rang i sur., 2006)

Tijela aferentnih živaca za prijenos signala boli leže u ganglijima dorzalnih korjenova, vlakna ulaze u kralježničnu moždinu kroz dorzalne korjenove i završavaju u sivoj tvari kralježnične moždine. Većina nociceptivnih vlakana završava u površinskim slojevima kralježnične moždine, C-vlakna i neka Aδ-vlakna inerviraju tijela neurona u lamini I i II, dok druga A-vlakna prodiru dublje u laminu V. Stanice u laminama I i V daju većinu projekcijskih putova iz kralježnične moždine za talamus (**Slika 1**). (Rang i sur., 2006)

Mehanizam bolnog osjeta sastoji se od 4 povezana procesa: transdukcije, kondukcije, transmisije i percepcije. *Transdukcija* je pretvaranje podražaja receptora za bol (nocireceptora) u akcijski potencijal. *Kondukcija* je prijenos akcijskog potencijala od nocireceptora kroz akson neurona do njegova završetka u dorzalnim rogovima kralježnične moždine. *Transmisija* je sinaptičko provođenje akcijskog signala s jednog neurona na drugi i prateća modulacija osjeta boli. *Percepcija* je spoznaja boli u somatosenzornoj kori velikog mozga. (Gamulin i sur., 2011)

Nakon aktivacije mehaničkim, toplinskim i kemijskim podražajem nocireceptori provode impulse prema kralježničnoj moždini preko Aδ- i C- vlakana. Bolni se podražaji iz stražnjeg

roga kralježnične moždine prenose u viša područja mozga preko neospinotalamičnog, paleospinotalamičnog i spinoretikularnog trakta (**Slika 1**). Neospinotalamični trakt prenosi brzu bol Aδ-vlaknima koja završavaju u lamini I stražnjih rogova te pobuđuju neurone drugog reda. Od tih neurona odlaze vlakna koja prednjom komisurom prelaze na suprotnu stranu kralježnične moždine te se anterolateralnim kolumnama penju prema mozgu. Manji broj vlakana završava u retikularnim područjima moždanog debla, a većina ih neprekinuta dolazi do ventrobazalnog kompleksa talamusa ili do stražnje skupine talamičnih jezgara. Signali se iz tih talamičnih područja prenose u druga bazalna područja mozga te u somatosenzoričku koru. Spinoretikularni sustav čine aksoni neurona slojeva VII i VIII, koji završavaju u retikularnoj formaciji i talamusu. Paleospinotalamični trakt prenosi sporu, trajnu bol koja se uglavnom provodi perifernim C-vlaknima, no može prenositi i neke signale koji dolaze Aδ-vlaknima. Gotovo sva periferna vlakna tog puta završavaju u laminama II i III stražnjih rogova kralježnične moždine (želatinozna tvar). Posljednji neuroni u niz šalju dugačke aksone od kojih se većina združuje s vlaknima brzog puta te prelaze prednjom komisurom na suprotnu stranu kralježnične moždine, a onda se anterolateralnim putom penju prema mozgu. Manji dio odlazi u talamus, dok većina završava u retikularnim područjima produljene moždine, ponsa i mezencefalona, tekalnom području mezencefalona te u sivom području oko akvedukta. (Demarin i sur., 2011; Guyton i Hall, 2006)



Slika 1: Putovi prijenosa bolnog signala prema mozgu (modificirano prema https://clinicalgate.com/78-pain)

1.1.3. Neurotransmitori uključeni u nocicepciju

Neurotransmitor ili kemijski posrednik djeluje na specifične receptore u membrani sljedećeg neurona te ga pobuđuje, inhibira ili na neki drugi način mijenja njegovu osjetljivost. (Guyton i Hall, 2006) Glavni ekscitacijski neurotransmitor svih neurona u nocicepcijskom putu jest glutamat koji djeluje preko ionotropnih AMPA (α-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kiselina) i NMDA (N-metil-D-aspartat) receptora na perifernim okončinama aferentnih živaca, neuronima dorzalnog roga kralježnične moždine i neuronima u talamusu, a u fiziološkim uvjetima luči se na periferiji prilikom aktivacije Aδ- i C-vlakana. Osim postsinaptički, djelovanje glutamata u dorzalnom rogu kralježnične moždine može biti i na presinaptičke NMDA receptore na membranama središnjih grana aferentnog senzornog vlakna čija je posljedica dodatno povećanje lučenja neurotransmitora u središnje sinapse. Osim glutamata, iz središnjih završetaka primarnih aferentnih neurona luče se i SP (engl.

substance P), polipeptid kalcitoninskog gena (engl. *calcitonin gene-related peptide*, CGRP), somatostatin, čimbenik lučenja kortikortopina (engl. *corticotropin releasing factor*, CRF), kolecistokinin, galanin i vazoaktivni intestinalni peptid (VIP). Neke od njih, poput SP i CGRP-a, putuju anterogradnim aksonalnim transportom na mjesto periferne ozljede te potiču vazodilataciju i lučenje tvari iz upalnih stanica koje senzitiziraju nociceptore, poput bradikinina, histamina i serotonina. (Bach-Rojecky, 2006; Milan 1999) Glutamat djeluje odmah, a njegov učinak traje samo nekoliko milisekundi, dok se SP oslobađa mnogo sporije, tijekom nekoliko sekundi ili čak minuta. Glutamat jest neurotransmitor koji uglavnom sudjeluje u prijenosu brze boli u središnjem živčanom sustavu, a SP je povezana sa sporom, trajnom boli. (Guyton i Hall, 2006)

Ekscitacijski interneuroni u kralježničnoj moždini vjerojatno djeluju preko ekscitacijskih aminokiselina, SP, neurotenzina, VIP-a. Inhibicijski interneuroni poput kolinergičnih, opioidnih i onih koji djeluju preko GABA-e (γ-amino maslačna kiselina) imaju važnu ulogu u regulaciji nociceptivne transmisije te mogu izravno djelovati na neurone u dorzalnom rogu kralježničke moždine (postsinaptički) i/ili na središnje aferentne završetke (presinaptički). (Bach-Rojecky, 2006) GABA jest glavni inhibicijski neurotransmiror u središnjem živčanom sustavu koji se u visokoj koncentraciji nalazi u interneuronima lamine I i II te se pretpostavlja da ima važnu ulogu u sprječavanju akutne i kronične boli. Dušikov oksid (NO) jest ključni neurotransmitor u modelima trajne boli, a prisutnost GABA-e i NO-a u izoliranim stanicama sugerira njihovu suprotnu ulogu u tim neuronima. (Demarin i sur., 2011)

1.1.4. Kontrola boli putem descedentnih inhibitornih putova

Descedentni, silazni putovi čine jedan od vratarskih mehanizama kontrole provođenja impulsa u kralježničnoj moždini. Ključni dio tog analgezijskog sustava je periakveduktalna siva tvar (engl. *periaqueductal grey area*, PAG). PAG prima mnoge projekcije iz drugih dijelova mozga, uključujući hipotalamus, korteks i talamus te se smatra da predstavlja mehanizam preko kojega korteks i druge regije mozga kontroliraju „ulazna vrata“ bolnih signala u kralježničnoj moždini. Glavni neuronski put koji aktivira podraživanje PAG-a, proteže se prema području produžene moždine blizu središnje linije, poznatom kao velika jezgra rafe (lat. *nucleus raphe magnus*, NRM), a odande se proteže k vlaknima smještenim u dorzolateralnim funikulima kralježnične moždine koja čine sinaptičke veze s interneuronima

stražnjih rogova sive tvari kralježnične moždine. Glavni neurotransmitor u tim sinapsama je serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT), a interneuroni djeluju tako da inhibiraju okidanje spinotalamičnih neurona preko retikularne paragigantocelularne jezgre (lat. *nucleus reticularis paragigantocellularis*, NRPG). Moguće jest da ovaj descedentni inhibirotni sustav čini dio kruga regulacije putem negativne povratne sprege, preko kojeg je prijenos signala u stražnjim rogovima sive tvari kralježnične moždine kontroliran razinom aktivnosti koja dolazi do talamusa. Descedentni inhibitorni put je vjerojatno važno mjesto djelovanja opioidnih analgetika. PAG i želatinozna tvar bogate su živčanim stanicama koje sadrže enkefalin, a opioidni antagonisti kao što je nalokson, mogu spriječiti analgeziju izazvanu elektrostimulacijom PAG-a, što upućuje na zaključak da opioidni peptidi djeluju kao neurotransmitori u tom sustavu. (Rang i sur., 2006)

Podraživanjem električnom strujom periakveduktalne sive tvari ili velike jezgre rafe mogu se potisnuti jaki bolni signali koji ulaze stražnjim spinalnim korjenovima. Potiskivanje boli može se postići i podraživanjem područja na još višim razinama mozga, koja pobuđuju PAG, a to su periventrikularne jezgre u hipotalamusu koje se nalaze uz treći ventrikul i, u manjoj mjeri, medijalni snop telencefalona, koji je također u hipotalamusu. (Guyton i Hall, 2006)

Najvažniji neurotransmitori u analgezijskom sustavu su enkefalin i serotonin. Vlakna koja potječu iz PAG-a, paraventrikularnih jezgara te velike jezgre rafe na završetcima luče enkefalin, a na završetcima vlakana u stražnjim rogovima kralježnične moždine luči se serotonin koji pak potiče lokalne interneurone na lučenje enkefalina. Enkefalin uzrokuje presinaptičku i postsinaptičku inhibiciju ulaznih vlakana za bol vrste C i Aδ na mjestima gdje ta vlakna u stražnjim rogovima tvore sinapse. Prema tome zaključujemo da analgezijski sustav može zaustaviti bolne signale na mjestu njihova ulaska u kralježničnu moždinu. (Guyton i Hall, 2006) Postoji i noradrenergički put iz LC-a (lat. *locus coeruleus*) koji ima sličan inhibitorni učinak na prijenos bolnih signala u stražnjim rogovima sive tvari kralježnične moždine. (Rang i sur., 2006)

1.2. Uloga hipotalamusa u osjetu boli

Hipotalamus ujedinjuje mnogo funkcija uključujući endokrinu i autonomnu kontrolu, termoregulaciju, spavanje, budnost, apetit, emocionalno ponašanje te upravlja biološkim ritmom mnogih tjelesnih funkcija. Neurološke studije kod ljudi i animalne studije na životinjama pokazuju da hipotalamus igra važnu ulogu u nociceptivnom procesuiranju, posebno kod primarnih glavobolja kao što su migrena te *cluster* glavobolja. (Matharu, 2007)

Iako čini manje od 1% moždane mase, jedan je od najvažnijih nadzornih potova limbičkog sustava koji je bitan za emocionalni doživljaj boli. Hipotalamus šalje izlazne signale u tri smjera: 1) prema natrag i dolje u moždano deblo, posebice u retikularna područja mezencefalona, ponsa i produljene moždine, a zatim u periferne živce autonomnog živčanog sustava, 2) prema gore u viša područja diencefalona i velikog mozga, posebice u prednji dio talamusa te 3) u hipotalamični držak (infundibulum) za nadzor nad većinom sekrecijskih funkcija stražnjeg i prednjeg režnja hipofize. (Guyton i Hall, 2006)

Jaggi i Singh (2011) istraživali su doprinos različitih dijelova mozga pa tako i hipotalamusa u razvoju neuropatske boli uzrokovane oštećenjem perifernih živaca. Ozljeda perifernog živca dovodi do promjene u ekspresiji neurotransmitora, neuromodulatora, hormona rasta i neurološki aktivnih molekula u primarnim aferentnim neuronima smještenim u ganglijima dorzalnih korjenova kralježnične moždine. Precizna uloga različitih dijelova mozga u procesuiranju neuropatske boli još se treba istražiti jer mnogi centri u mozgu, uključujući periakveduktalnu sivu tvar i jezgru ponsa *locus coeruleus*, sudjeluju u modulaciji neuropatske boli. Nadalje, ti centri mogu u kordinaciji jedni s drugima potaknuti ili spriječiti bol. Opisana je antinociceptivna uloga posteriornog dijela hipotalamusa zbog analgetskih utjecaja oreksina-A, oksitocina te električne stimulacije i aktivacije D_2 receptora u neuropatskim modelima, ali i pronociceptivna uloga zbog aktivacije mikroglije i promjena u razini SP. (Jaggi i Singh, 2011)

Hipotalamus ima dobro dokumentirane nociceptivne aferentne i eferentne veze s centrima u mozgu i kralježničnoj moždini. Opisani su inhibitorni utjecaji hipotalamusa na neurone dorzalnih rogova i njegovo sudjelovanje u regulaciji neuroendokrinih mehanizama. Studije koje koriste električnu stimulaciju navode da su antinociceptivni učinci, na razini prednjeg hipotalamusa/preoptičke regije, posredovani aktivacijom silaznih putova boli i modulacijom neuralne aktivnosti dorzalnih rogova (Simpson i sur., 2008).

U animalnim modelima neuropatske boli, promjene opažene u hipotalamusu koje pridonose razvoju neuropatske boli uključuju promjene u razini SP u mozgu štakora. Imunohistokemijskim tehnikama pokazano je povećanje ekspresije CD11b (marker aktivacije mikroglije) u hipotalamusu štakora koji su podvrgnuti ozljedi ishijadičnog živca (lat. *nervus ischiadicus*). Nadalje, u istoj studiji pokazano je da primjena memantina (antagonist NMDA receptora) smanjuje neuropatsku bol uz normalizaciju koncentracije SP i smanjenje aktivacije mikroglije. (Takeda i sur., 2009)

S druge strane, posteriorni dio hipotalamusa (PH) pokazuje antinociceptivne učinke u različitim eksperimentalnim studijama. U CCI modelu (engl. *Chronic Constriction Injury*, kronična konstrikcijska ozljeda živca) neuropatske boli stimulacija posteriornog dijela hipotalamusa smanjuje neuropatsku bol. U istoj je studiji pokazano da primjena antagonista receptora za oreksin-A (SB-334867) blokira analgetske učinke posredovane posteriornim hipotalamusom. To dokazuje da su neuroni u posteriornom hipotalamusu koji sadrže oreksin-A odgovorni za antinociceptivne učinke u neuropatskom modelu boli i modificiraju nocicepciju u dorzalnom rogu kralježnične moždine. Neurotransmitor oreksin-A je peptid nađen u neuronima hipotalamusa koji pokazuje učinke na smanjenje boli u CCI modelu. (Jeong i Holden, 2009)

Pokazano je da aktivacija D_2 receptora u regiji hipotalamusa A11, smještenoj u posteriornom hipotalamusu, smanjuje aktivnost neuralnih putova iz periakveduktalne sive tvari koji su uključeni u razvoj i održavanje hiperalgezije povezane s perifernom neuropatijom. (Jagii i Singh, 2011)

Nadalje, Dafny i suradnici (1998) opisali su lateralni hipotalamus kao supraspinalno mjesto uključeno u modulaciju boli. Postavljeno je pet kriterija za definiranje mjesta u središnjem živčanom sustavu koja sudjeluju u modulaciji boli, a lateralni hipotalamus je udovoljio zahtjevima svih pet kriterija: 81% neurona lateralnog hipotalamusa reagira na dolazeće bolne podražaje, fokalna električna stimulacija udaljenog centra uključenog u modulaciju boli modulira aktivnost lateralnog hipotalamusa na bolne podražaje, sistemska ili lokalna primjena morfina modulira aktivnost lateralnog hipotalamusa na bolne podražaje, fokalna električna stimulacija lateralnog hipotalamusa uzrokuje bihevioralnu analgeziju proporcionalno intenzitetu podražaja utvrđenog testom trzanja repom (engl. *tail flick test*) te lokalna aplikacija morfina u lateralni hipotalamus uzrokuje analgetski učinak. (Dafny i sur., 1998)

Kemijska i električna stimulacija lateralnog hipotalamusa može uzrokovati analgeziju, a važnost lateralnog hipotalamusa u modulaciji nociceptivnog ponašanja istražena je u akutnim modelima boli. Ezzantpanah i sur. (2015) istražili su utjecaj direktne kemijske stimulacije lateralnog hipotalamusa s karbakolom, agonistom kolinergičkih receptora, u formalinskom testu kao modelu dugotrajne upalne boli. Karbakol je mikroinjiciran u lateralni hipotalamus 5 minuta prije formalinskog testa. Otkriveno je da karbakol blokira nociceptivne odgovore u obje faze formalinom uzrokovane boli što sugerira da lateralni hipotalamus modulira formalinom uzrokovanu bol duž spinalnih i supraspinalnih područja. (Ezzatpanah i sur., 2015)

Paraventrikularna jezgra hipotalamusa (lat. *nucleus paraventricularis hypothalami,* PVN) inhibira spinalnu nocicepciju. Bihevioralni i elektrofiziološki pristupi pokazali su da je analgezija inducirana električnom stimulacijom PVN posredovana otpuštanjem hormona oksitocina iz silaznih vlakana jezgre do stražnjeg roga kralježnične moždine. Mjerena je ekspresija c-Fos (indirektni marker neuralne aktivnosti) nakon električne stimulacije PVN, a rezultati pokazuju povećanu ekspresiju c-Fos ne samo u dorzalnom rogu kralježnične moždine, već i u strukturama za koje se smatra da sudjeluju u inhibiciji boli (*nucleus raphe magnus*, *locus coeruleus* i periakveduktalna siva tvar). Time se može zaključiti da postoji funkcionalna interakcija između ovih struktura kako bi se osigurao mehanizam endogene analgezije. (Condes-Lara i sur., 2015)

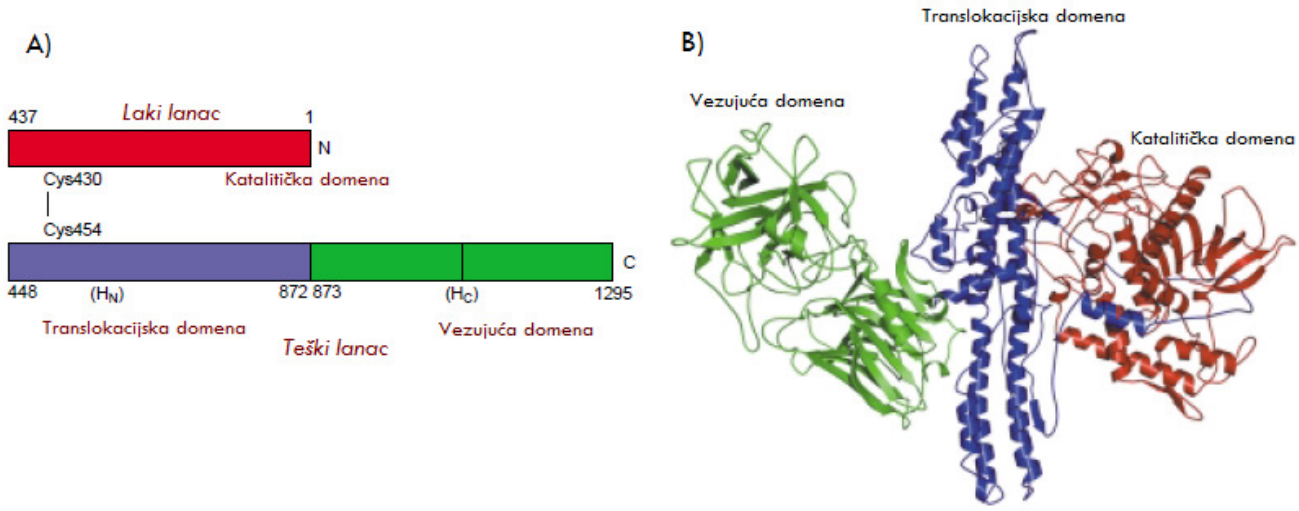
Aktivacija hipotalamusa bitna je u patogenezi *cluster*-glavobolje, primarne glavobolje iz skupine trigeminalnih autonomnih cefalgija, karakterizirane jednostranom, žestokom boli u području oka i čela, s tendencijom periodičnog ponavljanja nakon remisije. Promatranjem aktivnosti mozga tijekom glavobolje pomoću pozitronske emisijske topografije (PET) zabilježeno je izbijanje u posteriornom dijelu hipotalamusa. Uzrok aktivacije posteriornog hipotalamusa i širenja boli u lice nije poznat. Postoje pretpostavke da se bol širi paroksizomalnim parasimpatičkim izbijanjem koje se provodi gornjim površinskim živcem i sfenopalatinalnim ganglijem. (Brinar i sur, 2009)
Aktivnost u ipsilateralnom, posteriornom hipotalamusu kao mogućem generatoru ove glavobolje, objašnjava prirodu napadaja koji se pojavljuju ritmično i cirkadijalno u pravilnim periodima. Smanjena koncentracija testosterona u plazmi muškaraca za vrijeme *clustera* također upućuje na ulogu hipotalamusa u regulaciji glavobolje. Na to upućuje i činjenica da melatonin, marker regulacije cirkadijalnog ritma u ljudi, kao i drugi hormoni hipofize, imaju promijenjeno 24-satno stvaranje. (May i sur., 1998)

1.3. Botulinum toksin

Botulinum toksin je potentni neurotoksin kojeg proizvodi gram-pozitivna, sporogena bakterija *Clostridium botulinum* u anaerobnim uvjetima. Poznato je 7 serotipova botulinum toksina (A-G), a nedavno je pronađen osmi, serotip H te je u fazi karakterizacije (Barash i Arnon, 2014). Sistemska intoksikacija botulinum toksinom uzrokuje botulizam, karakteriziran mlohavom paralizom mišića koja je posljedica blokade otpuštanja acetilkolina iz motoneurona u sinaptičku pukotinu u motornoj ploči. (Singh, 2006) Procijenjena letalna doza za čovjeka je 1 μg/kg kod peroralnog unosa, 10–13 ng/kg unešenog inhalacijskim putem te 1–2 ng/kg prilikom intravenske ili intramuskularne primjene. (Kumar i sur., 2016) Smatra se jednom od najtoksičnijih tvari u prirodi, a zbog mogućnosti širenja zrakom i apsorpcije inhalacijom predstavlja potencijalno bojno oružje. S druge strane, potencijal njegove primjene u kliničkoj praksi kontinuirano raste te se pročišćeni oblik u pikomolarnim dozama koristi u liječenju različitih kliničkih stanja praćenih povećanom kontraktilnošću mišića. Važna su i istraživanja primjene BT-A u liječenju boli.

1.3.1. Struktura botulinum toksina tipa A

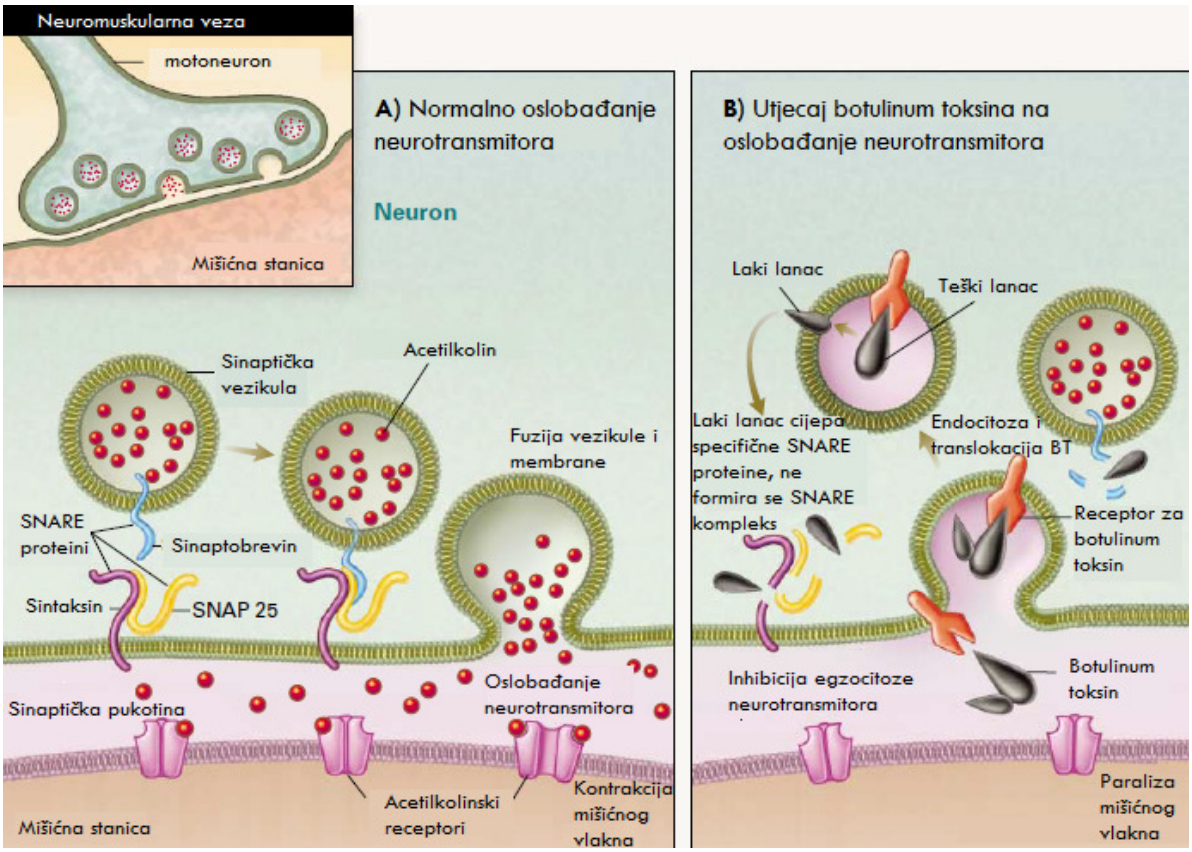
Bakterija *C. botulinum* sintetizira BT-A kao kompleks od 900 kDa. Biološki aktivni dio kompleksa veličine je 150 kDa, dok najveći dio kompleksa čine neurotoksinu pridruženi proteini (engl. *neurotoxin-associated proteins,* NAP). Oni nisu fiziološki aktivni već se smatra da utječu na stabilnost kompleksa i štite biološki aktivni dio molekule od proteolize i denaturacije pri visokoj temperaturi ili kiselom pH, primjerice prilikom prolaska kroz probavni sustav. (Gao i Ji, 2013) Biološki aktivna komponenta građena je od 1296 aminokiselina, a sastoji se od lakog (50 kDa) i teškog lanca (100 kDa) koji se postranslacijski spajaju disulfidnom vezom na položaju Cys430-Cys454 (Turton i sur., 2002), kao što prikazuje **Slika 2**. Laki lanac posjeduje o cinku ovisnu endopeptidaznu aktivnost te specifično cijepa ključne proteine u procesu vezanja sinaptičkih mjehurića s membranom, dok je teški lanac odgovoran za vezanje neurotoksina za presinaptičke membrane. Trodimenzionalna kristalna struktura sadrži tri funkcionalne domene veličine ~50kDa: vezujuću, translokacijsku te katalitičku (**Slika 2**). One su strukturno različite i usmjerene tako da nema kontakta između katalitičke i vezujuće domene. (Turton i sur., 2002)



Slika 2: Struktura botulinum toksina tipa A: a) shematski prikaz dvolančane strukture BT-A; b) kristalna struktura BT-A (modificirano prema Turton i sur., 2002)

1.3.2. Mehanizam djelovanja botulinum toksina

Botulinum toksin ponaša se kao metaloproteaza koja u perifernim živčanim završetcima cijepa proteine bitne za neuroegzocitozu, uzrokujući dugotrajnu no reverzibilnu inhibiciju otpuštanja neurotransmitora. (Kukreja i Singh, 2015) Iako točan mehanizam nije u potpunosti razriješen, djelovanje botulinum toksina na neuromuskularnoj vezi odvija se u nekoliko koraka prikazanih na **Slici 3**. Ovi koraci uključuju vezanje neurotoksina za specifična akceptorska mjesta na membrani presinaptičkih živčanih završetaka, internalizaciju toksina u živčanu stanicu i njegovu translokaciju uzduž endosomalne membrane te intracelularno proteolitičko cijepanje proteina važnih za otpuštanje neurotransmitora. (Kukreja i Singh, 2015)



Slika 3: Mehanizam djelovanja botulinum toksina na neuromuskularnoj vezi. A) Normalno otpuštanje neurotransmitora; B) Utjecaj botulinum toksina na spriječavanje formiranja SNARE kompleksa te inhibiciju egzocitoze neurotransmitora iz presinaptičkog neurona (modificirano prema Rowland, 2002)

Prvi korak jest specifično vezanje domene teškog lanca toksina visokim afinitetom na površinske receptore presinaptičkih živčanih završetaka. Predložen je model dvostrukog receptora gdje se vezujuća domena teškog lanca prvo veže s koreceptorima koje čine specifični membranski polisijalogangliozidi te nastaje kompleks koji se pomiče prema glikoproteinskom receptoru koji je specifičan za određeni tip neurotoksina, primjerice SV2 (engl. *synaptic vesicle glycoprotein 2*) za koji će se vezati BT-A. (Kukreja i Singh, 2015) Sljedeći korak jest internalizacija toksina procesom endocitoze. Zatim slijedi proces translokacije koji započinje promjenama u strukturi toksina pod utjecajem kiselog pH unutar endosoma, nakon čega slijedi ugradnja toksina u membranu endosoma, translokacija kratkog lanca s luminalne na citosolnu površinu membrane endosoma, redukcija disulfidne veze, te konačno odvajanje kratkog od dugog lanca. (Simpson, 2004) Laki lanac BT-A translocira se u citosol te djeluje kao metaloproteaza koja katalizira cijepanje proteina SNAP-25

(sinaptosomalni protein veličine 25 kDa, *engl. synaptosomal associated protein of 25 kDa*). SNAP-25, sintaksin i sinaptobrevin (membranski vezikularni protein, *engl. vesicule-associated membrane protein,* VAMP) spadaju u porodicu SNARE proteina koji omogućuju fuziju membrane sinaptičkog mjehurića i presinaptičke membrane neurona. Botulinum toksini tipa A i E cijepaju SNAP-25; tipovi B, D, F i G hidroliziraju sinaptobrevin, a tip C cijepa SNAP-25 i sintaksin. Uklanjanje/cijepanje bilo koje komponente SNARE kompleksa onemogućuje njegovo funkcioniranje u procesu neuroegzocitoze. Time ne dolazi do fuzije vezikule koja sadrži neurotransmitor s membranom presinaptičkog neurona, čime se inhibira otpuštanje neurotransmitora u sinaptičku pukotinu te se zaustavlja prijenos signala. (Turton i sur., 2002; Kukreja i Singh, 2015)

Djelovanje BT na periferni živčani završetak je reverzibilno i ne dovodi do trajne promjene neuromuskularne veze. Nakon sinaptičke blokade kolinergičnih živčanih završetaka, neuron stvara nove ogranke na motornoj ploči i nove sinapse koje zamjenjuju izvorne, kako bi se obnovio proces egzocitoze acetilkolina i prijenos signala. Kada se funkcija glavnog neurona obnovi, novonastali ogranci i sinapse se povlače. (Dressler i Benecke, 2007)

1.3.3. Klinička primjena botulinum toksina

Injiciranjem vrlo male količine pročišćenog neurotoksina u određeni mišić ili parasimpatički inervirani organ postiže se reverzibilna, dugotrajna denervacija koja može biti klinički vrlo korisna. Terapijska primjena BT-A prvi put je odobrena 1989. godine od strane FDA (*engl. Food and Drug Administration*) za liječenje strabizma, blefarospazma i hemifacijalnog spazma. 2000. godine terapijska primjena proširuje se na cervikalnu distoniju, te dječju cerebralnu paralizu i spasticitet mišića različite etiologije. Slijedilo je odobravanje primjene toksina u kozmetičke svrhe za tretiranje bora, čime je botulinum toksin postao izrazito popularan u javnosti. (Janković 2004) Od tada do danas BT-A je najčešće korišten terapijski protein, a terapijska primjena proširila se s poremećaja karakteriziranih pretjeranom mišićnom kontrakcijom na hipersekrecijske poremećaje autonomnog živčanog sustava (npr. primarna aksilarna hiperhidroza) te na poremećaje karakterizirane bolnom preosjetljivosti (npr. kronična migrena). Registrirana su tri pripravka BT-A: onabotulinumtoxin A (Botox®, Botox Cosmetic®), abobotulinumtoxin A (Dysport®) i incobotulinumtoxin A (Xeomin®). Osim BT-A, u terapijske se svrhe koristi još BT-B (rimabotulinumtoxin B, Myoblock®). (Drinovac Vlah, 2017)

1.3.4. Analgetsko djelovanje BT-A

Povoljno djelovanje BT-A na bol najprije je opisano u bolesnika s cervikalnom distonijom gdje je uočeno da analgetsko djelovanje nastupa prije, traje dulje i jače je izraženo od miorelaksirajućeg djelovanja BT-A. (Janković i Schwartz, 1990) Različita klinička opažanja ukazuju da BT-A djeluje na smanjenje boli i u stanjima koja nisu praćena povećanom mišićnom kontrakcijom poput neuropatske boli, tenzijske glavobolje, migrene, bolova u donjem djelu leđa itd. (Bach-Rojecky, 2006) Ispitivanja su dovela 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. Do danas je antinociceptivno djelovanje BT-A istraživano u eksperimentalnim modelima različitih vrsta boli prikazanih u **Tablica 1.** (Drinovac Vlah, 2017)

Prvi dokaz o antinociceptivnom djelovanju BT-A dobiven je na formalinskom modelu upalne boli u štakora, u kojem su formalin i BT-A injicirani u plantarnu površinu šape, a izveden je u laboratorijima proizvođača Botoxa® (Allergan, SAD). Formalinom uzrokovan model upalne boli sastoji se od dvije faze, prve koja je posljedica izravne stimulacije receptora formalinom te traje 15 min i druge faze koja je posljedica djelovanja upalnih medijatora i senzitizacije. BTA inhibira formalinom uzrokovano bolno ponašanje tijekom druge faze kada se aplicira 5h do 12 dana prije formalinskog testa. (Cui i sur., 2004) Uočeno jest i smanjenje imunoreaktivnosti c-Fos proteina u dorzalnom rogu kralježnične moždine. (Aoki, 2005) Pretpostavljeno je da antinociceptivno djelovanje BT-A kod upalne boli uključuje inhibiciju lučenja glutamata (i/ili neuropeptida) iz perifernih aferentnih završetaka, čime je smanjena periferna, a posredno i središnja senzitizacija. (Cui i sur, 2004; Aoki 2005)

U modelu kirurški izazvane ozljede *n. ishiadicusa* pokazano jest da periferno primjenjen BT-A značajno smanjuje mehaničku i toplinsku hiperalgeziju. (Bach-Rojecky i sur., 2005) Uz to, periferna primjena BT-A značajno je smanjila ili u potpunosti poništila pojačanu osjetljivost na mehaničke i termalne podražaje kod kapsaicinom i karagenanom uzrokovane upalne boli. (Bach-Rojecky i Lacković, 2005) U ovom je istraživanju smanjenje hiperosjetljivosti bilo značajno kada je BT-A primjenjen 6, ali ne i 1 dan prije indukcije boli i upale.

Kao što je navedeno, Cui i suradnici pokazali su da periferna injekcija BT-A u eksperimentalnim modelima smanjuje bol te upalu. BT-A je djelovanjem na inhibiciju otpuštanja neurotransmitora na perifernim živčanim završetcima smanjio bolno ponašanje u

drugoj, upalnoj fazi formalinskog testa te je smanjen formalinom uzrokovan edem. (Cui i sur, 2004) Međutim, u modelima karagenanom uzrokovanog edema šape štakora i kapsaicinom uzrokovane ekstravazacije proteina plazme, pokazano je da BT-A, u dozama u kojima smanjuje bolnu preosjetljivost (5 i 10 i.j./kg), nema značajan učinak na upalu. (Bach-Rojecky i sur., 2008)

Učinkovitost BT-A ispitana je na modelu „zrcalne“ boli uzrokovane intramuskularnim injiciranjem kisele fiziološke otopine pH 4,0. Takva bilateralna bol je središnjeg porijekla na koju ne bi trebala utjecati periferna aplikacija BT-A. Međutim, pokazano je da periferno primjenjen BT-A smanjuje bol ipsilateralno te kontralateralno, što ukazuje na njegovo središnje mjesto djelovanja. Uz to, primjena kolhicina, blokatora aksonalnog transpotra, spriječila je učinak periferno primjenjenog BT-A na obe strane ozljede. Ti su rezultati ukazali na važnost retrogradnog aksonalnog transporta, ali i na važnu ulogu središnjeg živčanog sustava za antinociceptivno djelovanje BT-A. (Bach-Rojecky i Lacković, 2009) Nadalje, na modelu dijabetičke neuropatske boli došlo je do bilateralnog smanjenja boli nakon unilateralne primjene BT-A što također potvrđuje uključenost središnjeg živčanog sustava u antinociceptivnom djelovanju BT-A na neuropatsku bol. (Bach-Rojecky i sur, 2010)

Antonucci i suradnici (2008) u svojoj su studiji postavili hipotezu o retrogradnom aksonalnom transportu BT-A putem centralnih neurona i motoneurona te transcitozi do aferentnih sinapsi u kojima cijepa SNAP-25. Pocijepani SNAP-25 proteini pronađeni su u kontralateralnom dijelu hipokampusa nakon unilateralne primjene BT-A. (Antonucci i sur., 2008) Ovi nalazi proširili su dotadašnja saznanja o antinociceptivnom učinku BT-A.

Biokemijskim i imunohistokemijskim metodama dokazivanja produkta katalitičke aktivnosti BT-A pocijepanog SNAP-25 proteina, pokazana je njegova prisutnost i u senzornim nociceptivnim jezgrama u kralježničnoj moždini nakon periferne primjene BT-A, čime se dodatno potvrđuju spomenuti prvi dokazi o aksonalnom transportu. (Matak i sur., 2011)

U svrhu otkrivanja mehanizma središnjeg antinociceptivnog djelovanja BT-A istražena je moguća uključenost opioidnog i GABA-ergičnog sustava. Naltrekson primijenjen sistemski prije formalinskog testa poništio je antinociceptivno djelovanje BT-A. Inhibicija učinka BT-A na bol i c-Fos ekspresiju primjenom opioidnih antagonista ukazuje da središnje antinociceptivno djelovanje BT-A može biti povezano s endogenim opioidnim sustavom (uključujući μ-opioidne receptore). (Drinovac i sur., 2013) Primjenom bikukulina, antagonista GABA-A receptora, dolazi do inhibicije antinociceptivnog učinka BT-A na modelu upalne

boli uzrokovane formalinom i modelu alodinije uzrokovane transekcijom ishijadičnog živca, čime se pokazuje da je antinociceptivno djelovanje BT-A povezano i s aktivnosti GABA-A receptora na spinalnoj razini. (Drinovac i sur., 2014a)

Tablica 1: Animalni eksperimetalni modeli boli u kojima BT-A smanjuje spontanu bol ili preosjetljivost na bolne podražaje (Drinovac Vlah, 2017)

Vrsta boli	Eksperimentalni modeli
PODRUČJE INERVACIJE N. *ISCHIADICUSA*	
UPALNA BOL	
Površinska	Formalinski test (šapa) Injiciranje kapsaicina u šapu Injiciranje karagenana u šapu Injiciranje alillizotiocijanata u šapu
Duboka	Injiciranje CFA[1] u koljeni zglob
NEUROPATSKA BOL	
Mononeuropatije	Parcijalno presijecanje *n. ischiadicusa* Konstrikcijska ozljeda *n.ischiadicusa* (CCI) Podvezivanje spinalnog živca Presijecanje ventralnih korjenova
Polineuropatije	Dijabetička polineuropatija uzrokovana streprozotocinom Polineuropatija uzrokovana paklitakselom
OSTALO	Postoperativna bol uzrokovana zarezivanjem *m. gastrocnemiusa* Kronična bilateralna mišićna hiperalgezija uzrokovana dvostrukim injiciranjem kisele fiziološke otopine u *m. gastrocnemius*
PODRUČJE INERVACIJE N. TRIGEMINUSA	
UPALNA BOL	
Površinska	Orofacijalni formalinski test Injiciranje kapsaicina s.c. u područje brkova
Duboka	Injiciranje CFA[1] u temporomandibularni zglob
NEUROPATSKA BOL	Podvezivanje infraorbitalnog živca Podvezivanje velikog okcipitalnog živca
PODRUČJE INERVACIJE UNUTARNJIH ORGANA	
UPALNA BOL	
Visceralna	Prostatitis uzrokovan kapsaicinom Cistitis uzrokovan ciklofosfamidom Cistitis uzrokovan octenom kiselinom

[1] kompletni Freundov adjuvans (*engl. Complete Frenund's Adjuvant*)

1.4. Neuralni markeri boli: c-Fos i pERK

Bol je teško izmjeriti i kvantificirati u animalnim modelima. Tu pomažu neuralni markeri boli kao što su c-Fos, p-ERK (engl. *phosphorylated extracellular signal-regulated kinase*), te mjerenja koncentracije neuropeptida poput CGRP-a (engl. *calcitonin gene-related peptide,* polipeptid kalcitoninskog gena), dinorfina i drugih. Najkorišteniji marker je c-Fos, a ujedno je metoda njegove detekcije jeftina, jednostavnija i reproducibilna.

c-Fos, protein protoonkogena *c-fos*, koristi se kao neuralni marker boli u istraživanjima duže od trideset godina. Hunt i sur. (1987) prvi su izvijestili da periferna bolna stimulacija stražnje šape štakora dovodi do značajne indukcije c-Fos u površinskim i dubokim laminama dorzalnih rogova kralježnične moždine te da sinaptička transmisija može inducirati brze promjene u ekspresiji gena u postsinapričnim neuronima. (Hunt i sur, 1987) Od tada se c-Fos široko koristi kao alat za proučavanje nociceptivnih puteva te kao neuralni marker za testiranje učinkovitosti analgetskih spojeva. (Gao i Ji, 2009)

Neposredni rani gen *c-fos* se brzo i trenutno eksprimira u neuronima kao odgovor na stimulaciju receptora. Aktivacija transkripcije gena javlja se unutar nekoliko minuta nakon stimulacije, s akumulacijom mRNA koja doseže svoj vrhunac nakon približno 30-40 minuta. Gen kodira nuklearni protein c-Fos čija je razina ekspresije najveća približno dva sata nakon indukcije transkripcije gena. c-Fos formira heterodimerni kompleks s drugim proteinom iz Jun porodice. Fos-Jun kompleks veže se na AP-1 mjesto DNA u jezgri i regulira ekspresiju ciljanih gena. Stoga je c-Fos uključen u kaskadu prijenosa signala koja povezuje ekstracelularne događaje s dugoročnim unutarstaničnim adaptacijama. Ekspresija gena se najčešće mjeri Nothern blot analizom ili *in situ* hibridizacijom, a protein se najčešće vizualizira korištenjem imunohistokemijskih tehnika. (Harris, 1998)

U neuralnim stanicama c-Fos može biti aktiviran bolnim senzornim stimulacijama uključujući kemijske podražaje (npr. formalin, kapsaicin, karagenan), mehaničku, termalnu i električnu stimulaciju. Od otkrića 1987. da periferna bolna stimulacija dovodi do pojave c-Fos imunoreaktivnosti u neuronima površinskih lamina dorzalnih rogova kralježnične moždine, mnoge studije koristile su imunohistokemiju kako bi identificirale c-Fos ekspresiju u spinalnim neuronima kao odgovor na bolnu stimulaciju, a svaka je studija povrdila povezanost c-Fos ekpresije i nocicepcije. c-Fos se može koristiti kao indirektni marker za neuralnu aktivaciju nakon bolnog podražaja u istraživanjima kraniofacijalne, orofacijalne i

dentalne boli u animalnim modelima. Analiziranje neurona aktiviranih kraniofacijalnom stimulacijom može biti korišteno za proučavanje neuralnih putova putem kojima se prenosi nociceptivna informacija te kao test za učinkovitost analgetskih svojstva različitih lijekova. (Supronsinchai i Storer, 2015)

Imunohistokemijska detekcija proteina c-Fos može se koristiti kao funkcionalni marker neurona osjetljivih na promjene krvnog tlaka te krvnog volumena. Kontrolirano krvarenje ili infuzija hipotenzivnog spoja nitroprusida ili hidralazina inducira pojavu c-Fos imunoreaktivnosti u nekoliko grupa centralnih neurona: piriformni korteks, centralna jezgra amigdale, parabrahijalna jezgra, supraoptička i paraventrikularna jezgra, *locus coeruleus*, ventrolateralna medula, jezgra solitarnog trakta i intermediolateralna kolumna u kralježničnoj moždini. Koristeći c-Fos ekspresiju kao marker, mogu se otkriti novi centralni neuroni koji mogu biti uključeni u integrativnu kontrolu kardiovaskularnog sustava. (Dun i sur., 1995)

Korištenje c-Fos kao markera za neuralnu aktivaciju nakon bolne stimulacije i ozljede tkiva ima mnoge prednosti. Ponajprije, c-Fos ekspresija nakon bolne stimulacije je brza te relativno specifična i snažna. c-Fos se eksprimira samo u jezgri pa se tako c-Fos imunohistokemija može izvesti u kombinaciji s drugim postupcima kako bi se identificirala svojstva c-Fos obilježenih neurona. (Jao i Gi, 2009)
U usporedbi s drugim tehnikama, lako je odrediti preciznu lokaciju neurona koji se aktiviraju nakon različitih bolnih stimulacija. Nadalje, c-Fos ekspresija može se lako kvantitativno analizirati brojanjem neurona koji su imunoreaktivno označeni. U odnosu na primjerice elektrofiziološko praćenje aktivacije neurona tijekom bolnog podražaja, imunohistokemijska karakterizacija c-Fos je jednostavna metoda koja ne zahtjeva korištenje anestezije tijekom bolnog podražaja budući da se životinje žrtvuju i tkivo skuplja nakon završenih bihevioralnih mjerenja. (Harris, 1998)

No, postoje i brojni nedostaci ovog pristupa. Ponajprije, indukcija c-Fos ekspresije, nije toliko dinamična u usporedbi s podacima dobivenih elektrofiziološkim praćenjem. Stimulacija mora biti prilično jaka i dovoljno dugotrajna kako bi se postigla razina c-Fos ekspresije koja se može kvantificirati, a idealni parametri za otkrivanje promjena u nocicepciji korištenjem c-Fos ekspresije možda neće biti prihvatljivi za mjerenje boli na bihevioralnoj razini. Nadalje, gen *c-fos* se ne eksprimira u svim neuronima niti u dijelovima neurona nakon aktivacije, npr. stanice ganglija dorzalnih korjenova ne eksprimiraju *c-fos* uslijed bolne stimulacije. Zato izostanak c-Fos ekspresije ne mora nužno značiti izostank neuralne aktivnosti. Isto tako,

postoji rizik od lažno pozitivnih rezultata jer je moguće da se gen *c-fos* i njegov produkt eksprimiraju u drugim stanjima i procesima neovisno o bolnoj stimulaciji. (Harris, 1998)
c-Fos se ekprimira samo u nekim vrstama neurona nakon periferne stimulacije, pa može biti nepotpuni marker za nociceptivnu aktivnost. Dodatno, neki neuroni eksprimiraju c-Fos protein u odsudstvu bolnog podražaja. Stoga eksperimenti koji analiziraju c-Fos ekspresiju trebaju biti pažljivo izvedeni jer drugi podražaji i dubina anestezije mogu utjecati na rezultate. (Bullitt, 1990)

Drugi često korišten marker boli jest kinaza regulirana izvanstaničnim signalom (ERK) koja spada u porodicu mitogenom-aktiviranih proteinskih kinaza (MAPK). ERK se aktivira fosforilacijom s kinazom MEK. ERK aktivacija zahtjeva signalnu kaskadu koja uključuje uzastopnu aktivaciju Ras, Raf i MEK. Nakon aktivacije fosforilirana ERK (pERK) može biti premještena u jezgru kako bi aktiviralo nekoliko transkripcijskih faktora primjerice CREB (engl. *cAMP-response element binding protein*) koji je potreban za transkripciju mnogih neuralnih gena i dugoročne sinaptičke plastičnosti. ERK ima važnu ulogu u reguliranju mitoze, proliferaciji, diferencijaciji te preživljavanju stanica sisavaca tijekom razvoja, a novija istraživanja pokazuju da je ERK uključen u neuralnu i sinaptičku plastičnost te u modulaciju boli. (Jao i Gi, 2009) Ji i sur. (1999) su imunohistokemijskom metodom pokazali pERK ekspresiju u spinalnim neuronima kralježnične moždine nakon periferne stimulacije stražnje šape štakora intraplantarnom injekcijom kapsaicina. pERK ekspresija je vrlo brza i specifična te je pretežno inducirana u neuronima dorzalnih rogova te u medijalnim, površinskim laminama kralježnične moždine. (Ji i sur. 1999) Stoga se pERK ekspresija također može koristiti kao marker aktivacije nociceptivnih neurona kralježnične moždine.

Zaključno, oba opisana markera imaju određene sličnosti i razlike. Primjerice, nakon bolnog podražaja (npr. injekcija kapsaicina) ili ozljede tkiva, c-Fos se inducira nakon 30-60 minuta, a pERK može biti induciran unutar jedne minute; c-Fos je često induciran u jezgrama neurona, dok pERK može biti induciran u različitim strukturama neurona kao što su jezgra, citoplazma, aksoni i dendriti te se čak može inducirati u mikrogliji i astrocitima kralježnične moždine nakon ozljede živca. c-Fos i pERK mogu se koristiti kao markeri za neuralnu aktivaciju nakon bolne stimulacije ili ozljede tkiva, no pERK ekspresija je dinamičnija i čini se kao bolji marker za centralnu senzitizaciju. (Gao i Ji, 2009)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Utjecaj BT-A na bol te njegovo antinociceptivno djelovanje proučavano je u mnogim pretkliničkim i kliničkim studijama. Klinička opažanja ukazuju na dugotrajano (višemjesečno) smanjenje boli uz minimalne nuspojave nakon jednokratne lokalne primjene malih doza BT-A. Analgetik takvih karakteristika mogao bi biti od posebne važnosti za farmakoterapiju boli.

BT-A u nanomolarnim količinama smanjuje patološku bolnu preosjetljivost (spontanu bol, hiperalgeziju i alodiniju) različitih uzroka (akutnu i neuropatsku), no nema utjecaja na akutne pragove boli. U perifernoj boli (područje inervacije *n. ischiadicusa*) BT-A pokazuje brže djelovanje u nižim dozama nakon primjene u spinalni kanal (intratekalno, i.t.) u odnosu na perifernu subkutanu primjenu. (Bach-Rojecky, 2006) Budući da BT-A ne prolazi krvno-moždanu barijeru te dosada nije pokazan njegov transport putem neurona s periferije do supraspinalnih regija, pretpostavka jest da je njegovo djelovanje na perifernu bol segmentalno, tj. da ne uključuje više supraspinalne regije.

Za razliku od periferne i intratekalne primjene, istraživanjima na modelima visceralne (Drinovac i sur., 2014b) i karagenanom uzrokovane zrcalne boli (Drinovac i sur., 2016) u kojima je BT-A apliciran supraspinalno u cisternu magnu, uočen je izostanak antinociceptivnog učinka. Rezultati brojnih istraživanja ukazuju na središnje mjesto djelovanja, najvjerojatnije na razini dorzalnog roga kralježnične moždine gdje periferno primijenjen BT-A dolazi retrogradnim aksonalnim transportom. Međutim, središnji mehanizam kojim BT-A utječe na nocicepciju još uvijek nije dovoljno poznat te su potrebna daljna istraživanja.

Cilj ovog rada je istražiti antinociceptivni učinak BT-A nakon njegove primjene u moždane komore (intracerebroventrikularno, i.c.v.) na dobro istraženom modelu upalne boli uzrokovane primjenom formalina u šapu štakora, promatrajući aktivaciju c-Fos proteina hipotalamusu. Ovo istraživanje dio je većeg projekta čiji je cilj razjašnjenje uključenosti različitih supraspinalnih struktura u mjesto i mehanizam djelovanja BT-A na bol.

3. MATERIJALI I METODE

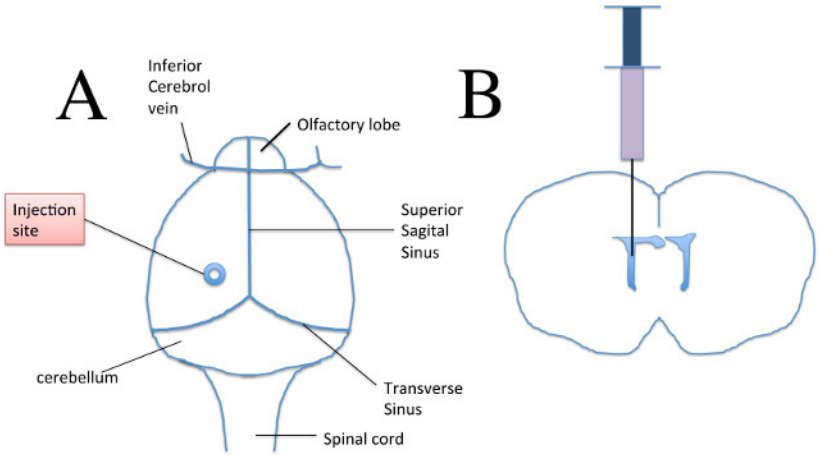
3.1. Tkivo životinje

U ovom diplomskom radu analizirani su uzorci poprečnih prereza mozga mužjaka štakora soja Wistar u dobi od 3 do 4 mjeseca, težine 300 do 400 g, uzgajanih na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Uzorci su pripremljeni nakon provedenih bihevioralnih mjerenja, odnosno testova praćenja bolnog ponašanja, koje su provele osobe osposobljene za rad s pokusnim životinjama.

Prilikom izvođenja pokusa na laboratorijskim životinjama slijedio se Zakon o zaštiti životinja (NN 125/13) i smjernice Međunarodne udruge za istraživanje boli (*International Association for Study of Pain*, IASP). Za obavljanje pokusa na projektima, kojih je ovaj diplomski rad dio, dobivena je dozvola nadležnog Etičkog povjerenstva.

3.2. Ispitivana tvar - botulinum toksin tipa A

U pokusu je korišten botulinum toksin tipa A (Botox®, Allergan, SAD). Svaka bočica Botox® sadrži 100 i.j. (~4,8ng) pročišćenog Clostridium botulinum toksina tipa A u obliku liofilizata. Jedna internacionalna jedinica odgovara količini toksina koja nakon i.p. primjene uzrokuje smrt 50% miševa (LD50 = 0,048 ng = 1 i.j.). Sadržaj toksina u bočici je otopljen u fiziološkoj otopini tako da se dobije potrebna doza od 1 i.j./kg. U ovom eksperimentu BT-A je jednoj skupini pokusnih životinja injiciran u lateralne moždane komore (intracerebroventrikularno, i.c.v.) u dozi od 1 i.j./kg i ukupnom volumenu od 5 µl (podijeljeno u dvije komore) 5 dana prije izvođenja formalinskog testa (**Slika 4**).



Slika 4. Shematski prikaz mjesta injiciranja u lateralne moždane komore (prilagođeno prema: https://www.jove.com/files/ftp_upload/54164/54164fig2large.jpg)

3.3. Metoda uzrokovanja eksperimentalne upalne boli: formalinski test

Kako bi se uzrokovala bol, na štakorima je proveden formalinski test tako da im je supkutano u plantarnu površinu desne stražnje šape (intraplantarno, i.pl.) injicirano 50 µL 5%-tne otopine formalina. Nakon injiciranja štakori su vraćeni u prozirni kavez na promatranje tijekom sat vremena. Kao pokazatelj bolnog ponašanja životinje praćen je broj lizanja i trzanja šape tretirane formalinom. Vrijeme promatranja podijeljeno je u dvije faze: akutna faza I (0–15 min) u kojoj je odgovor uzrokovan izravnom stimulacijom perifernih živčanih vlakana formalinom i upalna faza II (15–60 min) koja je uzrokovana perifernom senzitizacijom kao posljedicom upale te oslobađanja upalnih medijatora. (Bach Rojecky, 2006)

3.4. Eksperimentalni protokol

U eksperimentu su korištene dvije skupine životinja: prva, kojoj je 5 dana prije formalinskog testa i.c.v. injiciran BT-A i druga – kontrolna, kojoj je i.c.v. injiciran odgovarajući volumen fiziološke otopine. U svakoj su skupini bila po 3 štakora. Dva sata nakon i.pl. formalinske injekcije štakori su duboko anestezirani kloralhidratom (300 mg/kg) te podvrgnuti transkardijalnoj perfuziji s paraformaldehidom radi uzimanja tkiva mozga za pripremu uzoraka potrebnih za imunhohistokemijsku analizu.

3.4.1. Priprema uzoraka za imunohistokemijsku analizu

Mozak žrtvovanih životinja najprije je čuvan na temperaturi od 4 °C preko noći u 10%-tnoj otopini sukroze u paraformaldehidu. Idući dan uzorci su stavljeni na čuvanje u 30%-tnu otopinu sukroze u fosfatnom puferu (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS), nakon čega su smrznuti na -80 °C do uporabe. Smrznuti su uzorci izrezani na kriostatu (Leica, Germany) na prereze debljine 30 μm. Dio diencefalona koji obuhvaća hipotalamus podvrgnut je imunohistokemijskoj analizi.

3.4.2. Kemikalije

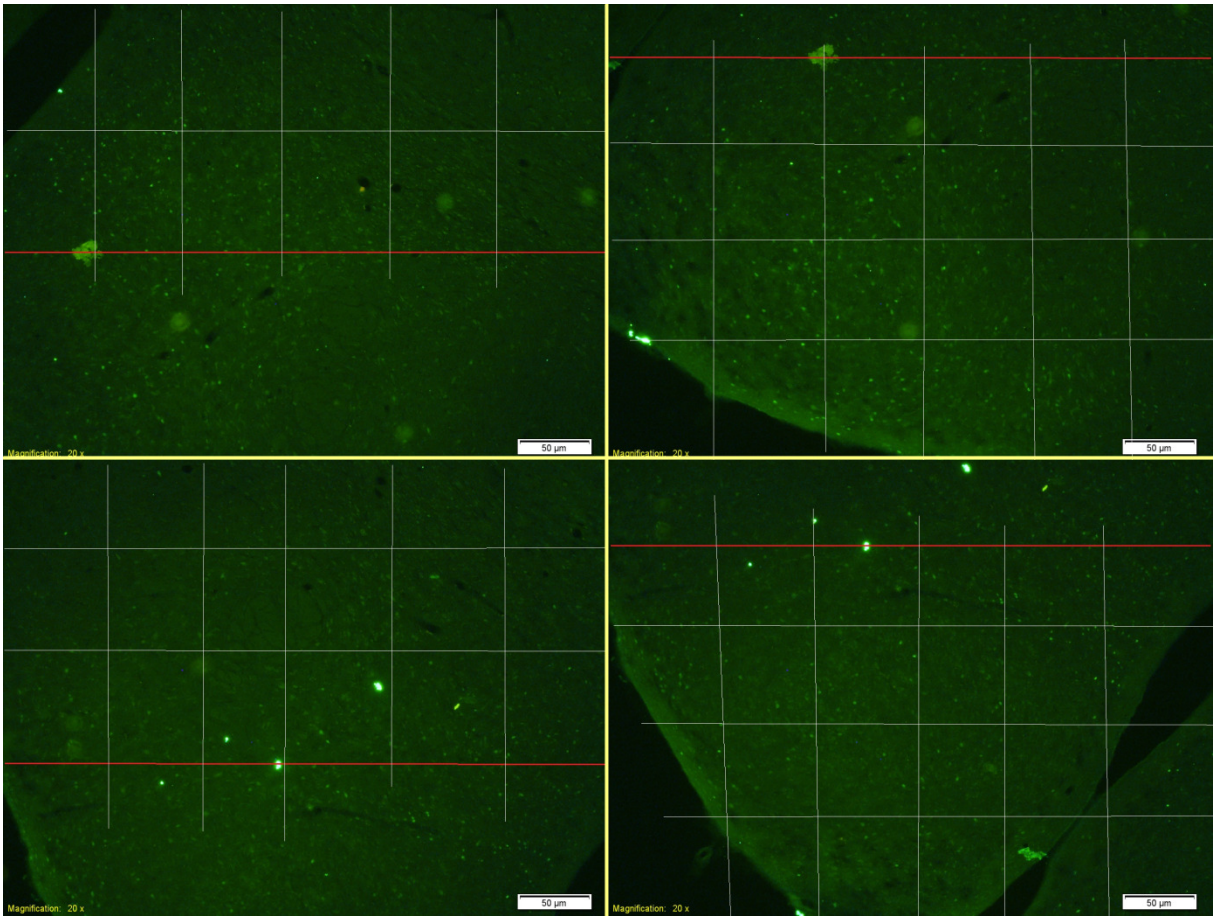
Za imunohistokemijsku analizu korištene su sljedeće kemikalije: paraformaldehid (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, SAD), Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, SAD), kozji serum (Vector, Inc., Burlingame, CA, SAD), c-Fos zečje primarno poliklonsko protutijelo (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, SAD), sekundarno zečje protutijelo Alexa Fluor-448 (Invitrogen, 3 Carlsbad, CA, SAD) i medij za očuvanje fluorescencije Fluorogel (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, SAD).

3.4.3. Imunohistokemija

Uzorci su stavljeni u jažice s PBS-om te su ispirani 3 puta po 5 minuta u 0,25%-tnoj otopini PBS – TritonX100 (PBS-T). Nespecifično vezanje blokirano je 10%-tnim kozjim serumom tijekom 60 min i potom su uzorci inkubirani sa zečjim anti-c-Fos primarnim protutijelom (1:500), razrijeđenim u 1%-tnom kozjem serumu, tijekom noći na sobnoj temperaturi. Sljedeći dan isprani su 3 puta po 5 minuta PBS-T-om. Zatim su inkubirani s fluorescentnim sekundarnim mišjim protutijelom Alexa Fluor-448 (1:400), razrijeđenim u 1%-tnom kozjem serumu, 2 h, u tami, na sobnoj temperaturi. Uzorci su ponovo isprani 3 puta po 5 minuta PBS-T-om i potom naneseni na predmetna stakalca za mikroskopiranje. Prije stavljanja pokrovnog stakalca, na uzorke je stavljen medij za očuvanje fluorescencije Fluorogel®. Prerezi su vizualizirani fluorescentnim mikroskopom (Olympus BX51, Olympus, Tokyo, Japan) spojenim na digitalnu kameru (Olympus DP-70, Olympus, Tokyo, Japan) i fotografirani koristeći 10x i 40x povećanje.

3.5. Analiza rezultata

Na dobivenim su fotografijama analizirani i kvantificirani c-Fos pozitivni neuroni. Slike su obrađene u programu *Microsoft Paint*. U svakoj su skupini, ispitivana i kontrolna, bile po tri životinje i za svaku od njih analizirana su tri nasumična prereza hipotalamusa. Brojani su c-Fos pozitivni neuroni na prerezima, a zatim je za svaku životinju izračunata srednja vrijednost, te je na kraju od srednjih vrijednosti za sve tri životinje iz skupine izračunata srednja vrijednost pojedine skupine. Za analizu jednog prereza mozga životinje koji obuhvaća hipotalamus, brojani su c-Fos pozitivni neuroni sa četiri slike, na način da se najprije u programu *Microsoft Paint* označi koji se dijelovi slika preklapaju, a zatim se napravi „mreža“ i u svakoj dobivenoj regiji broje se c-Fos pozitivni neuroni, kako bi analiza imunoreaktivnosti bila što reproducibilnija i kompletnija. (**Slika 5)**



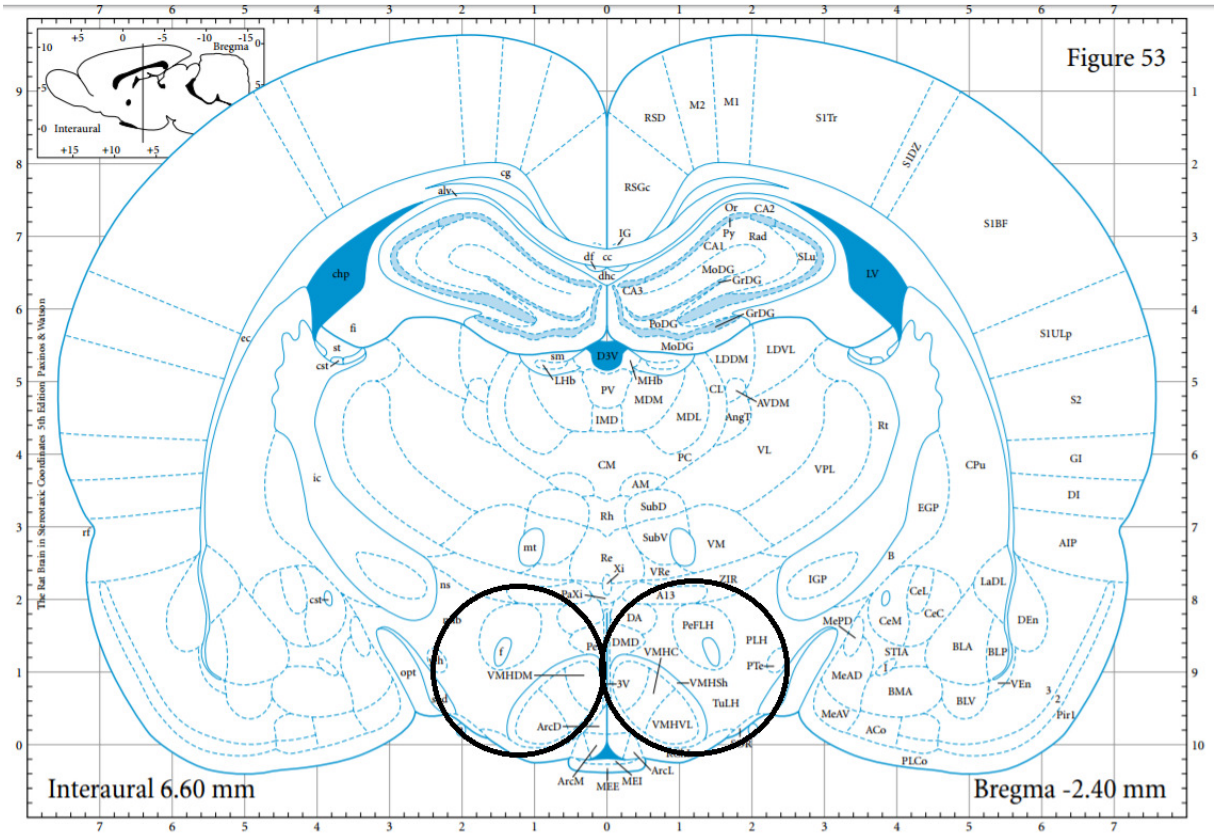
Slika 5. Prikaz prereza mozga (ispitivana skupina) koji se sastoji od četiri slike. Svaka slika podijeljena je u manje regije te je svaka regija analizirana

3.6. Statistička obrada podataka

Rezultati pokusa prikazani su kao aritmetička sredina ± standardna pogreška (engl. *standard error of mean,* SEM) i prikazani u obliku grafa sa stupcima. Razlika varijanci analizirana je jednosmjernom analizom (*engl. One-way ANOVA*) i Tukey HSD testom. Kao statistički značajna vrijednost uzeta je $p< 0,05$.

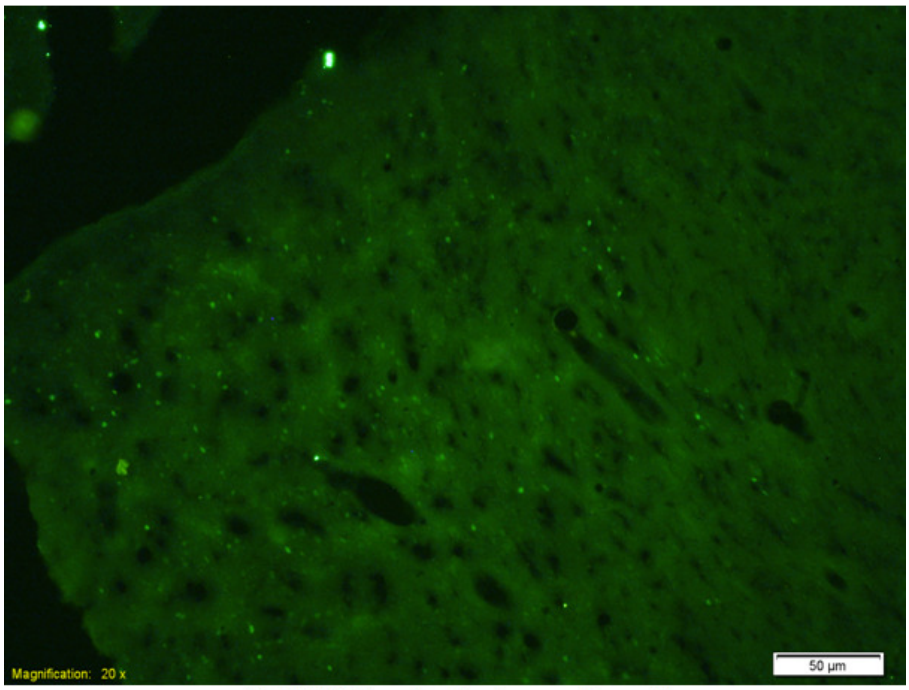
4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom diplomskom radu proučavan je utjecaj BT-A na aktivaciju neurona u hipotalamusu, regiji mozga koja ima važnu ulogu u nocicepciji, promatrajući ekspresiju c-Fos proteina kao markera aktivacije neurona. Metodom imunohistokemije ispitana je imunoreaktivnost u području hipotalamusa i to u dorzomedijalnoj hipotalamičnoj jezgri, dorzalnom hipotalamičnom području, perifornikalnom dijelu lateralnog hipotalamičnog područja, pedunkularnom dijelu lateralnog hipotalamusa, forniksu, arkuatnoj hipotalamičnoj jezgri, ventromedijalnoj hipotalamičnoj jezgri (centralni, ventrolateralni, dorzomedijalni dio) te tubelarnom dijelu lateralnog hipotalamusa (**Slika 6**).

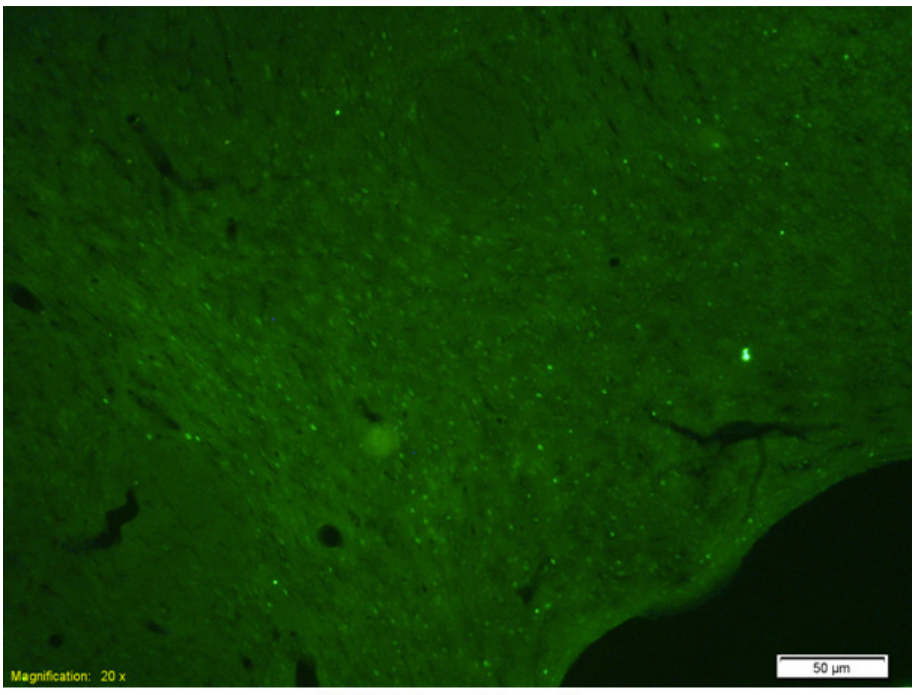


Slika 6. Shematski prikaz poprečnog prereza mozga štakora koji obuhvaća hipotalamus (Pakison i Watson, 2004) Kratice: DMD=dorzomedijalna hipotalamična jezgra, dorzalni dio; DA=dorzalno hipotalamično područje; PeFLH=perifornikalni dio lateralnog hipotalamusa; PLH=pedunkularni dio lateralnog hipotalamusa; f=forniks; Arc=arkuatna hipotalamična jezgra; VMH=ventromedijalna hipotalamična jezgra; TULH=tubelarni dio lateralnog hipotalamusa

Analiziran je broj c-Fos pozitivnih neurona na tri odabrana presjeka mozga koji obuhvaćaju hipotalamus za svaku od dvije skupine životinja, ispitivane skupine kojoj je, prije formalinskog testa, u lateralne moždane komore (i.c.v.) injiciran BT-A te kontrolne skupine kojoj je i.c.v. injicirana fiziološka otopina (**Slika 7**).



A) Fiziološka otopina i.c.v. + formalin



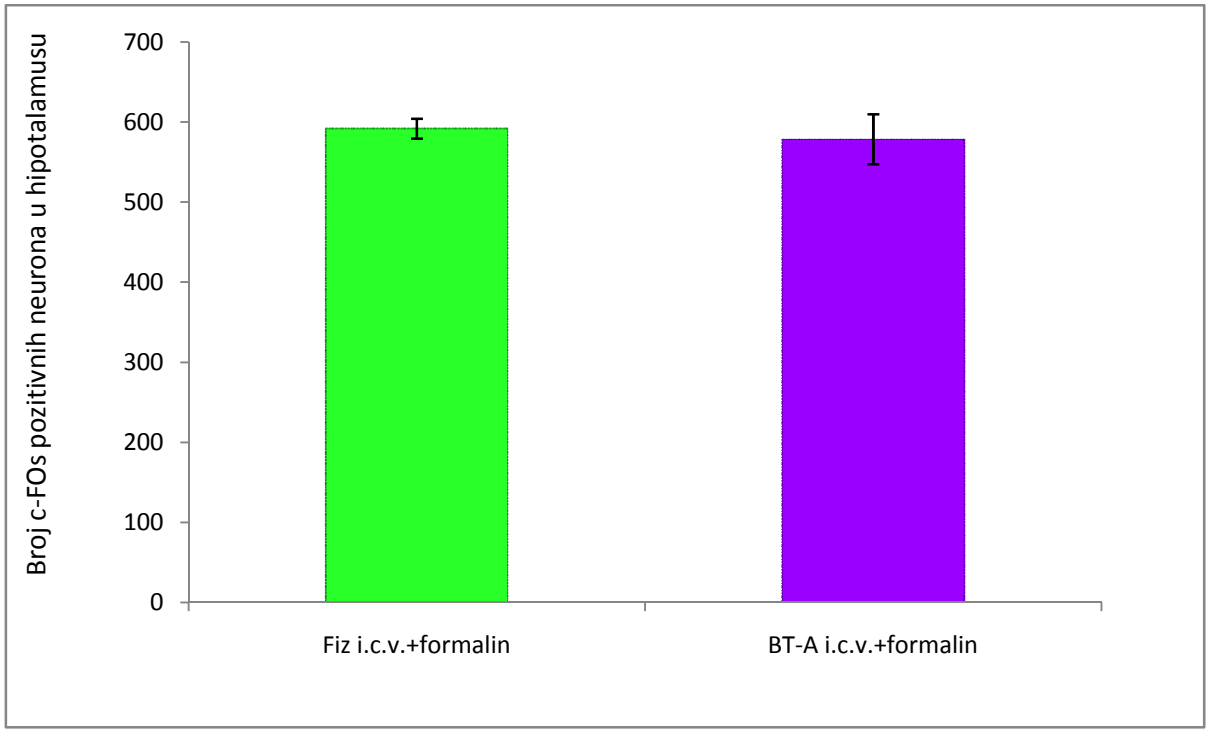
B) BT-A i.c.v. + formalin

Slika 7. Prikaz imunoreaktivnosti c-Fos pozitivnih neurona u poprečnom presjeku mozga koji obuhvaća hipotalamus u A) kontrolnoj i B) ispitivanoj skupini. Mjerilo: 50 µm

Provedena je kvantitativna analiza c-Fos pozitivnih neurona na fotografijama prereza pri povećanju 20X. Od svake životinje analizirana su 3 prereza hipotalamusa te je za svaku životinju izračunata srednja vrijednost. Od srednjih vrijednosti svih triju životinja iz skupine izračunata je srednja vrijednost pojedine skupine, kontrolne te ispitivane. Dobivene srednje vrijednosti pojedine skupine, strandardna devijacija i SEM prikazani su u tablici (**Tablica 2**) te grafički na slici (**Slika 8**).

Tablica 2. Prikaz rezultata kvantitativne analize c-Fos ekspresije izraženih kao srednja vrijednost ± SEM. Utjecaj BT-A na aktivaciju neurona u hipotalamusu promatran je kao broj c-Fos pozitivnih neurona.

Skupina	**A) Kontrolna skupina** (Fiziološka otopina i.c.v. + formalin)	**B) Ispitivana skupina** (BT-A i.c.v. + formalin)
Srednja vrijednost	592	578,8333
Standardna devijacija (SD)	21,48902	53,92665
SEM	12,40669	31,13456



Slika 8. Grafički prikaz rezultata c-Fos ekspresije. Utjecaj BT-A na aktivaciju neurona u hipotalamusu promatran je kao broj c-Fos pozitivnih neurona. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost c-Fos pozitivnih neurona u hipotalamusu ± SEM.

Zbog specifičnih karakteristika i mogućnosti terapijske primjene BT-A u boli, analgetsko djelovanje BT-A (v. Uvod) predmet je brojnih istraživanja s ciljem otkrivanja mehanizma djelovanja. Nasuprot općeprihvaćenoj teoriji o djelovanju BT-A na inhibiciju egzocitoze neurotransmitora na perifernim završecima osjetnih neurona, brojna novija istraživanja ukazuju da je antinociceptivno djelovanje BT-A na upalnu i neuropatsku bol središnjeg porijekla. No, još uvijek se ne zna dovoljno o mehanizmu djelovanja BT-A u SŽS-u. Ovim radom, koji je dio većeg eksperimentalnog projekta, istraženo je potencijalno mjesto središnjeg djelovanja BT-A injiciranjem toksina supraspinalno (i.c.v.) na modelu formalinom uzrokovane upalne boli, promatrajući ekspresiju c-Fos proteina kao markera aktivacije neurona. Sukladno brojnim istraživanjima, pretpostavka jest da BT-A u SŽS djeluje segmentalno na razini kralježnične moždine te da središnji učinak ne ostvaruje na supraspinalnoj razini.

Prvi eksperimentalni dokazi koji su ukazali na središnje mjesto antinociceptivnog djelovanja BT-A bili su učinkovitost nekoliko puta niže doze BT-A te brz nastup djelovanja nakon

središnje primjene, u usporedbi s perifernom. Primjerice, u modelu formalinom uzrokovane upalne boli pokazano je 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 primjenjen BT-A učinak postiže nakon 5 dana (Bach-Rojecky, 2006). Također, u modelu dijabetičke neuropatije uzrokovane streptozotocinom intratekalno primijenjen BT-A smanjio je mehaničku i termalnu hiperalgeziju u nižoj dozi u odnosu na perifernu primjenom (1 i.j./kg u odnosu na 3,5 i.j./kg), učinak je nastupio unutar 24 h te trajao duže (Bach-Rojecky i sur., 2010). Time se ukazuje da bi dorzalni rog kralježnične moždine mogao biti primarno mjesto njegovog antinociceptivnog djelovanja.

U eksperimentalnim modelima visceralne boli (peritonitis uzrokovan octenom kiselinom te kolitis uzrokovan kapsaicinom) pokazano jest da primjena BT-A (2 i.j./kg) u spinalni kanal smanjuje broj abdominalnih grčeva, a smanjenje boli pokazano je i imunohistokemijski promatrajući spinalnu c-Fos ekspresiju. Za razliku od intratekalne primjene, BT-A apliciran u istoj dozi u cisternu magnu (i.c.) nije ostvario antinociceptivni učinak, što također ukazuje da se djelovanje BT-A primarno odvija na razini kralježnične moždine. (Drinovac i sur., 2014b)

U modelu karagenanom uzrokovane bileteralne boli ispitan je antinociceptivni učinak BT-A, injiciranog periferno (intraplantarno, i.pl.) u desnu i u lijevu šapu, spinalno (intratekalno, i.t.) i supraspinalno (intracisternalno, i.c.). Periferna ipsilateralna (strana na kojoj je izazvana bol) primjena BT-A u dozi od 5 i.j./kg rezultirala je smanjenjem boli na obje strane nakon 5 dana, dok primjenjen kontralateralno nije djelovao. Intratekalno primjenjen BT-A djelovao je na bilateralno smanjenje boli 1 dan nakon primjene BT-A u spinalni kanal. Nasuprot tome, primjena BT-A u cisternu magnu nije rezultirala antinociceptivnim učinkom, čime se zaključuje da BT-A vjerojatno ne djeluje na supraspinalnoj razini (Drinovac Vlah i sur., 2016). U istoj je studiji pokazano da i.t. primjena μ-opioidnog antagonista naloksonazina i GABA-A antagonista bikukulina poništava antinociceptivno djelovanje periferno (ipsilateralno, i.pl.) primjenjenog BT-A , no supraspinalna primjena bikukulina u cisternu magnu (i.c.) te naloksonazina u moždane komore (i.c.v.) nije imala utjecaja na antinociceptivni učinak BT-A. Uz to, imunohistokemijskom analizom istražena je lokalizacija clSNAP-25 proteina, produkta enzimske aktivnosti BT-A. Primjenom BT-A u moždane komore pocijepani SNAP-25 pronađen je u talamusu, hipokampusu, periakveduktalnoj sivoj tvari i *locus coeruleusu*, a nakon primjene u cisternu magnu clSNAP-25 imunoreaktivnost najvećim je dijelom prisutna u produženoj moždini. Time je pokazano da

BT-A nakon i.c.v. i i.c. primjene putuje do dubokih supraspinalnih regija uključenih u nocicepciju, no ne djeluje na osjet boli, čime se potvrđuje hipoteza o segmentalnom antinociceptivnom djelovanju BT-A na razini kralježnične moždine. (Drinovac Vlah i sur., 2016)

Učinak BT-A u modelu formalinom uzrokovane boli ispitan je nakon dvije vrste supraspinalne primjene, jednoj skupini BT-A je primjenjen i.c., a drugoj i.c.v. te je bihevioralnim testiranjima pokazano da BT-A ne smanjuje bolno ponašanje tj. nema analgetski učinak (neobjavljeni rezultati). Eksperiment ovog diplomskog rada nastavak je tih bihevioralnih testiranja, te je, u skladu s tim rezultatima, pokazano da BT-A primijenjen u moždane komore (i.c.v.) ne smanjuje formalinom uzrokovanu bol. Pritom je promatrana ekspresija imunofluorescentno obilježenog c-Fos proteina (točkasta zelena imunoreaktivnost) u hipotalamusu, regiji mozga koja sudjeluje u modulaciji boli antinociceptivnim i pronociceptivnim učincima (v. Uvod). Rezultati kvantitativne analize ekspresije c-Fos proteina, koji se već duže vrijeme koristi kao neuralni marker boli, očekivano pokazuju aktivaciju ove regije nakon uzrokovanja upalne boli perifernom injekcijom formalina. Međutim, učinak BT-A nakon primjene u moždane komore (i.c.v.) je izostao, što se očituje podjednakim brojem aktiviranih neurona kod ispitivanih i kontrolnih uzoraka tkiva. Time se ponovo došlo do zaključka da se središnje antinociceptivno djelovanje BT-A odvija na razini kralježnične moždine te da ne uključuje više supraspinalne regije bitne za nocicepciju.

5. ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu istražen je antinociceptivni utjecaj supraspinalno primijenjenog BT-A (u moždane komore, intracerebroventrikularno, i.c.v) u modelu upalne boli uzrokovane perifernim injiciranjem formalina u šapu (područje inervacije *n. ischiadicusa*). Metodom imunohistokemije promatrana je ekspresija c-Fos pozitivnih neurona na poprečnim prerezima tkiva mozga štakora koji obuhvaćaju hipotalamus, supraspinalno mjesto uključeno u modulaciju boli. Rezultati kvantitativne analize c-Fos imunoreaktivnosti u hipotalamusu pokazali su da periferno injiciranje formalina dovodi do aktivacije neurona u toj regiji mozga, što se očekivalo s obzirom na rezultate ranijih ispitivanja. BT-A primijenjen u moždane komore nije ostvario antinociceptivni učinak, tj. nije primjećen smanjen broj c-Fos pozitivnih neurona u odnosu na kontrolnu skupinu kojoj je i.c.v. injicirana fiziološka otopina. Ovi rezultati u skladu su s hipotezom o središnjem segmentalnom antinociceptivnom djelovanju BT-A na spinalnoj razini, tj. razini kralježnične moždine na bol perifernog porijekla te isključuju antinociceptivno djelovanje BT-A na supraspinalnoj razini.

6. LITERATURA

Antonucci F, Rossi C, Gianfrancesci L, Rosetto O, Calleo M. Long-distance retrograde effects of botulinum neurotoxin A. *J Neurosci*, 2008, 28, 3689–96.

Aoki KR. Review of a proposed mechanism for the antinociceptive action of botulinum toxin type A. *Neurotoxicol,* 2005, 26(5), 785-93.

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

Bach-Rojecky L, Dominis M, Lacković Z. Lack of anti-inflammatory effect of botulinum toxin type A in exprimental models of inflammation. *Fundam Clin Pharmacol*, 2008, 22, 503-509.

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

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

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

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

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

Brinar V i suradnici. Neurologija za medicinare. Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 193-198, 207-208.

Bullitt E. Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J Comp Neurol*, 1990, 296(4), 517-530.

Cui M, Khanijou S, Rubino J, Aoki KR. Subcutaneous administration of botulinum toxin A reduces formalin-induced pain. *Pain,* 2004, 125–133.

Condés-Lara M, Martínez-Lorenzana G, Rubio-Beltrán E, Rodríguez-Jiménez J, Rojas-Piloni G, González-Hernández A. Hypothalamic paraventricular nucleus stimulation enhances c-Fosexpression in spinal and supraspinal structures related to painmodulation. *Neurosci Res*, 2015, 98, 59-63.

Dressler D, Benecke R. Pharmacology of therapeutic botulinum toxin preparations. *Disabil Rehabil*, 2007, 29, 1761–1768.

Dafny N, Dong WQ, Prieto-Gomez C, Reyes-Vazquez C, Stanford J, Qiao JT. Lateral hypothalamus: site involved in pain modulation. *Neuroscience*, 1996, 70(2), 449-460.

Demarin V, Bašić-Kes V i suradnici. Glavobolja i druga bolna stanja. Zagreb, Medicinska naklada, 2011, str. 8-21.

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,* 2014b, 745, 190-195.

Drinovac V, Bach-Rojecky L, Lacković Z. Association of antinociceptive action of botulinum toxin type A with GABA-A receptor. *J Neural Transm (Vienna)*, 2014a, 121(6), 665-669.

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

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

Dun NJ, Dun SL, Shen E, Tang H, Huang R, Chiu TH. c-fos expression as a marker of central cardiovascular neurons. *Biol Signals*, 1995, 4(3), 117-123.

Ezzatpanah S, Babapour V, Sadeghi B, Haghparast A. Chemical stimulation of the lateral hypothalamus by carbachol attenuated the formalin-induced pain behaviors in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 2015, 129, 105-110.

Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i suradnici. Patofiziologija Knjiga prva. Zagreb, Medicinska naklada, 2011, str. 453-469.

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

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. Medicinska fiziologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2006, str 598-603, 728-734.

Harris JA. Using c-fos as a Neural Marker of Pain. *Brain Res Bulletin*, 1998, 45(1), 1-8.

Hunt SP, Pini A, Evan G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*, 1987, 328(6131), 632-634.

Jaggi AS, Singh N. Role of different brain areas in peripheral nerve injury-induced neuropathic pain. *Brain Res*, 2011, 1381, 187-201.

Janković J, Schwartz K. Botulinum toxin injections for cervical dystonia. *Neurology,* 1990, 40(2), 277-280.

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

Ji RR, Baba H, Brenner GJ, Woolf CJ. Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. *Nat Neurosci*, 1999, 2(12), 1114-1119.

Kalló I, Molnár CS, Szöke S, Fekete C, Hrabovszky E, Liposits Z. Area-specific analysis of the distribution of hypothalamic neurons projecting to the rat ventral tegmental area, with special reference to the GABAergic and glutamatergic efferents. *Front Neuroanat*, 2015, 9, 112.

Kukreja R, Singh BR. The botulinum toxin as a therapeutic agent: molecular and pharmacological insights. *Res Rep Biochem*, 2015, 5, 173–183.

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

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

Matharu MS. The Hypothalamus, Pain, and Primary Headaches. *Headache*, 2007, 47(6), 963-968.

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

Pain. 2015., https://clinicalgate.com/78-pain, pristupljeno 5.4.2018.

Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates 5th Edition, Cambrige, Academic Press, 2004, Figure 53.

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

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Farmakologija. Zagreb, Golden marketing-Tehnička knjiga, 2006, str. 562-569.

Rowland LP. Stroke, spasticity, and botulinum toxin. *N Engl J Med*, 2002, 347(6), 382-383.

Simpson DA, Headley PM, Lumb BM. Selective inhibition from the anterior hypothalamus of C- versus A-fibre mediated spinal nociception. *Pain*, 2008, 136(3), 305-312.

Simpson LL. Identification of the major steps in botulinum toxin action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol,* 2004, 44, 167-193.

Singh BR. Botulinum neurotoxin structure, engineering, and novel cellular trafficking and targeting. *Neurotox Res*, 2006, 209, 73–92.

Supronsinchai W, Storer RJ. c-Fos: a neural activity marker for craniofacial pain research. *CU Dent J*, 2015, 38, 77-92.

Takeda K, Muramatsu M, Chikuma T, Kato T. Effect of memantine on the levels of neuropeptides and microglial cells in the brain regions of rats with neuropathic pain. *J Mol Neurosci*, 2009, 39(3), 380-390.

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

Jeong Y, Holden JE. The role of spinal orexin-1 receptors in posterior hypothalamic modulation of neuropathic pain. *Neuroscience*, 2009, 159(4), 1414-1421.

7. SAŽETAK

Botulinum toksin tipa A (BT-A) je neurotoksin kojeg proizvodi anaerobna bakterija *Clostridium botulinum*. Smatra se jednim od najpotentnijih bioloških toksina, no pročišćeni farmakološki pripravak u pikomolarnim dozama koristi se liječenju različitih kliničkih stanja praćenih povećanom kontraktilnošću mišića. Dugotrajno djelovanje nakon jednokratne primjene koje traje do nekoliko mjeseci daje mu prednost nad poznatim analgeticima te se sve više koristi u liječenju određenih tipova kronične boli, primjerice migrene. Brojna istraživanja bave se njegovim antinociceptivnim djelovanjem s ciljem otkrivanja mehanizma, kako bi se što bolje iskoristio u terapijske svrhe.

Nasuprot općeprihvaćenoj teoriji o djelovanju BT-A na inhibiciju egzocitoze neurotransmitora na perifernim završecima osjetnih neurona, rezultati brojnih istraživanja ukazuju na središnje mjesto djelovanja, najvjerojatnije na razini dorzalnog roga kralježnične moždine gdje periferno primijenjen BT-A dolazi retrogradnim aksonalnim transportom.

Ovim radom istraženo je potencijalno mjesto središnjeg djelovanja BT-A injiciranjem toksina u moždane komore (intracerebroventrikularno, i.c.v.) na modelu formalinom uzrokovane periferne upalne boli, promatrajući ekspresiju c-Fos proteina kao markera aktivacije neurona. Ispitivanja su provedena na tkivu mozga mužjaka štakora soja Wistar. BT-A je primijenjen i.c.v. u dozi od 1 i.j./kg, a kontrolnoj je skupini i.c.v. injicirana fiziološka otopina u odgovarajućem volumenu. Imunohistokemijskom metodom analizirana je ekspresija c-Fos proteina u hipotalamusu, regiji mozga koja sudjeluje u modulaciji boli. Rezultati kvantitativne analize ekspresije c-Fos proteina očekivano pokazuju aktivaciju ove regije nakon uzrokovanja upalne boli perifernom injekcijom formalina. Međutim, učinak BT-A nakon primjene u moždane komore (i.c.v.) je izostao, što se očituje podjednakim brojem aktiviranih neurona kod ispitivanih i kontrolnih uzoraka tkiva.

Ovi rezultati u skladu su s hipotezom o središnjem segmentalnom antinociceptivnom djelovanju BT-A na spinalnoj razini, tj. razini kralježnične moždine na bol perifernog porijekla te isključuju antinociceptivno djelovanje BT-A na supraspinalnoj razini. Međutim, potrebna su daljna istraživanja kako bi se otkrilo primarno mjesto središnjeg djelovanja BT-A.

SUMMARY

Botulinum toxin type A (BTX-A) is a neurotoxin produced by anaerobic bacteria *Clostridium botulinum*. It is considered as one of the most potent biological toxins, but purified pharmacological preparation in picomolar doses is used to treat various clinical conditions followed by increased muscular contractility. Long-term duration of effects after its single administration represents a special clinical value among known analgesics, so it is widely used in the treatment of certain types of cronic pain, such as migraine. Numerous researches are based on its antinociceptive action to find out the mechanism and improve its clinical use.

In contrast to generally accepted theory of BTX-A activity on inhibition of neurotransmitters release on peripheral endings of sensory neurons, the results of numerous researches point to its central site of action, most likely at the dorsal spinal cord level where peripherally applied BTX-A occurs by retrograde axonal transport.

This study investigated the potentially central site of BTX-A action after supraspinal administration (intracerebroventricular, i.c.v.) in inflammatory pain model induced by formalin injection, by observing c-Fos protein expression as a marker of neuronal activation. Experiment was performed on brain tissue of male Wistar rats. BTX-A was injected into the lateral cerebral ventricles (i.c.v.) in a dose of 1 U/kg. Control animals received 0,9% saline in the appropriate volumes. c-Fos expression was imunohistochemically examined in hypothalamus, a brain region involved in pain modulation. The results of the quantitative analysis of c-Fos protein expression show activation of this region because of inflammatory pain induced by peripheal formalin injection. However, BTX-A application into lateral cerebral ventricles failed to affect pain induced by formalin injection which is manifested by an equal number of activated neurons in the examined and control tissue samples.

These results are following the hypothesis of the central segmental antinociceptive action of BTX-A at spinal level, i.e. spinal cord level on the pain of peripheal origin and exclude antinociceptive action of BTX-A on supraspinal level. However, further research is needed to investigate the primary location of BT-A's central activity.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

UTJECAJ BOTULINUM TOKSINA TIPA A NA AKTIVACIJU NEURONA U HIPOTALAMUSU U EKSPERIMENTALNOJ UPALNOJ BOLI

Karolina Belošević

SAŽETAK

Botulinum toksin tipa A (BT-A) je neurotoksin kojeg proizvodi anaerobna bakterija *Clostridium botulinum*. Smatra se jednim od najpotentnijih bioloških toksina, no pročišćeni farmakološki pripravak u pikomolarnim dozama koristi se liječenju različitih kliničkih stanja praćenih povećanom kontraktilnošću mišića. Dugotrajno djelovanje nakon jednokratne primjene koje traje do nekoliko mjeseci daje mu prednost nad poznatim analgeticima te se sve više koristi u liječenju određenih tipova kronične boli, primjerice migrene. Brojna istraživanja bave se njegovim antinociceptivnim djelovanjem s ciljem otkrivanja mehanizma, kako bi se što bolje iskoristio u terapijske svrhe. Nasuprot općeprihvaćenoj teoriji o djelovanju BT-A na inhibiciju egzocitoze neurotransmitora na perifernim završecima osjetnih neurona, rezultati brojnih istraživanja ukazuju na središnje mjesto djelovanja, najvjerojatnije na razini dorzalnog roga kralježnične moždine gdje periferno primijenjen BT-A dolazi retrogradnim aksonalnim transportom. Ovim radom istraženo je potencijalno mjesto središnjeg djelovanja BT-A injiciranjem toksina u moždane komore (intracerebroventrikularno, i.c.v.) na modelu formalinom uzrokovane periferne upalne boli, promatrajući ekspresiju c-Fos proteina kao markera aktivacije neurona. Ispitivanja su provedena na tkivu mozga mužjaka štakora soja Wistar. BT-A je primijenjen i.c.v. u dozi od 1 i.j./kg, a kontrolnoj je skupini i.c.v. injicirana fiziološka otopina u odgovarajućem volumenu. Imunohistokemijskom metodom analizirana je ekspresija c-Fos proteina u hipotalamusu, regiji mozga koja sudjeluje u modulaciji boli. Rezultati kvantitativne analize ekspresije c-Fos proteina očekivano pokazuju aktivaciju ove regije nakon uzrokovanja upalne boli perifernom injekcijom formalina. Međutim, učinak BT-A nakon primjene u moždane komore (i.c.v.) je izostao, što se očituje podjednakim brojem aktiviranih neurona kod ispitivanih i kontrolnih uzoraka tkiva. Ovi rezultati u skladu su s hipotezom o središnjem segmentalnom antinociceptivnom djelovanju BT-A na spinalnoj razini, tj. razini kralježnične moždine na bol perifernog porijekla te isključuju antinociceptivno djelovanje BT-A na supraspinalnoj razini. Međutim, potrebna su daljna istraživanja kako bi se otkrilo primarno mjesto središnjeg djelovanja BT-A.

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

Rad sadrži: 40 stranica, 8 grafičkih prikaza, 2 tablica i 51 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: botulinum toksin tipa A (BT-A), bol, hipotalamus, c-Fos, imunohistokemija, formalinski test, antinociceptivno djelovanje BT-A

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Višnja Drinovac Vlah, *viša asistenitica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Renata Jurišić Grubešić, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: svibanj 2018.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

THE EFFECT OF BOTULINUM TOXIN TYPE A ON NEURONAL ACTIVATION IN HYPOTHALAMUS IN EXPERIMENTAL INFLAMMATORY PAIN

Karolina Belošević

SUMMARY

Botulinum toxin type A (BTX-A) is a neurotoxin produced by anaerobic bacteria *Clostridium botulinum*. It is considered as one of the most potent biological toxins, but purified pharmacological preparation in picomolar doses is used to treat various clinical conditions followed by increased muscular contractility. Long-term duration of effects after its single administration represents a special clinical value among known analgesics, so it is widely used in the treatment of certain types of cronic pain, such as migraine. Numerous researches are based on its antinociceptive action to find out the mechanism and improve its clinical use. In contrast to generally accepted theory of BTX-A activity on inhibition of neurotransmitters release on peripheral endings of sensory neurons, the results of numerous researches point to its central site of action, most likely at the dorsal spinal cord level where peripherally applied BTX-A occurs by retrograde axonal transport. This study investigated the potentially central site of BTX-A action after supraspinal administration (intracerebroventricular, i.c.v.) in inflammatory pain model induced by formalin injection, by observing c-Fos protein expression as a marker of neuronal activation. Experiment was performed on brain tissue of male Wistar rats. BTX-A was injected into the lateral cerebral ventricles (i.c.v.) in a dose of 1 U/kg. Control animals received 0,9% saline in the appropriate volumes. C-Fos expression was imunohistochemically examined in hypothalamus, a brain region involved in pain modulation. The results of the quantitative analysis of c-Fos protein expression show activation of this region because of inflammatory pain induced by peripheal formalin injection. However, BTX-A application into lateral cerebral ventricles failed to affect pain induced by formalin injection which is manifested by an equal number of activated neurons in the examined and control tissue samples. These results are following the hypothesis of the central segmental antinociceptive action of BTX-A at spinal level, i.e. spinal cord level on the pain of peripheal origin and exclude antinociceptive action of BTX-A on supraspinal level. However, further research is needed to investigate the primary location of BT-A's central activity.

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

Thesis includes: 40 pages, 8 figures, 2 tables and 51 references. Original is in Croatian language.

Keywords: botulinum toxin type A (BTX-A), pain, hypothalamus, c-Fos, immunohistochemistry, formalin test, antinociceptive action of BTX-A

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

Reviewers: **Lidija Bach-Rojecky**, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Višnja Drinovac Vlah, **Ph.D.** *Senior Assistant,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Renata Jurišić Grubešić, **Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2018.