Utjecaj botulinum toksina tipa A na aktivaciju neurona u periakveduktalnoj sivoj tvari u akutnom modelu boli

Drvar, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:982139

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

Martina Drvar

Utjecaj botulinum toksina tipa A na aktivaciju neurona u periakveduktalnoj sivoj tvari u akutnom modelu boli

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

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

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Lidiji Bach-Rojecky na svom prenesenom znanju te pomoći i strpljenju tijekom studija i izrade ovog diplomskog rada.
Također se zahvaljujem dr. sc. Višnji Drinovac Vlah, znanstvenoj novakinji Zavoda za farmakologiju, na pomoći pri izvođenju eksperimentalnog dijela rada i obradi rezultata.
Hvala dragim prijateljima i kolegama na nesebičnoj pomoći tijekom cijelog studija te radosti koju su unijeli u moje studentske dane.
Konačno, najveće hvala mojoj obitelji i Michellu na razumijevanju, motivaciji i bezuvjetnoj podršci.

SADRŽAJ

1 UVOD 1
1.1 Botulinum toksin 1
1.1.1 Struktura botulinum toksina tipa A 1
1.1.2 Mehanizam djelovanja botulinum toksina 2
1.1.3 Klinička primjena bolutinum toksina 5
1.2 Bol 6
1.2.1 Receptori i signalni putovi u prijenosu bolnih signala 7
1.2.2 Važni neurotransmitori pri nocicepciji 8
1.2.3 Periferna i središnja senzitizacija 9
1.2.4 Supresija boli u mozgu i kralježničkoj moždini 10
1.2.5 Mehanizam antinociceptivnog djelovanja botulinum toksina 11
1.3 c-Fos kao neuralni marker boli 13
2 OBRAZLOŽENJE TEME 15
3 MATERIJALI I METODE 16
3.1 Tkivo 16
3.1.1 Botulinum toksin A 16
3.2 Kemikalije 17
3.3 Eksperimentalni model boli: formalinski test 17
3.4 Eksperimentalni protokol 18
3.4.1 Imunohistokemija 18
3.5 Statistička analiza 19
4 REZULTATI I RASPRAVA 20
5 ZAKLJUČAK 25
6 LITERATURA 26
7 SAŽETAK/SUMMARY 31
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

1 UVOD

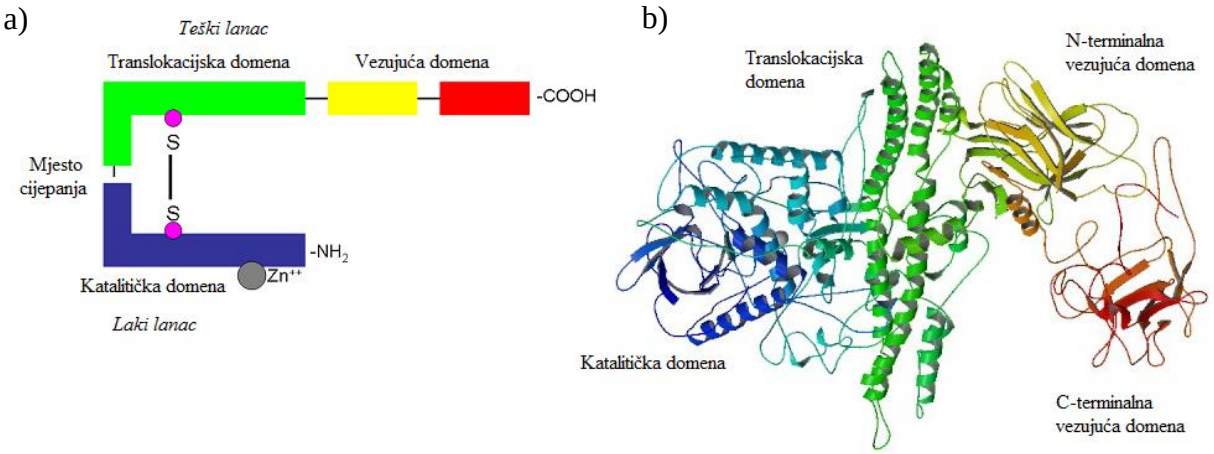
1.1 Botulinum toksin

Botulinum toksin je neurotoksin kojeg proizvodi bakterija Clostridium botulinum i jedna je od najotrovnijih poznatih bioloških tvari. Clostridium botulinum je anaerobna, gram-positivna, sporogena bakterija koja nastanjuje biljke, tlo, vodu i probavni trakt životinja (Nigam i Nigam, 2010). Poznato je 7 serotipova botulinum toksina (A-G), a nedavno je otkriven osmi, serotip H (Barash i Arnon, 2013). Tip A je najpotentniji toksin, a slijede tipovi B i F. Tipovi A, B i E obično su povezani s botulizmom u ljudi (Nigam i Nigam, 2010). Intoksikacija se najčešće događa putem neispravno obrađene hrane, no mogući put je i inhalacijski što je povezano s bioterorizmom (Arnon i sur., 2001). Rani simptomi bolesti uključuju umor, slabost, vrtoglavicu, zamagljenje vida, suha usta i poteškoće u gutanju i govoru. Bolest može napredovati u paralizu mišića vrata i ruku, nakon čega se zahvaćaju respiratorni mišići i mišići donjeg dijela tijela što može imati smrtne posljedice (http://www.who.int). Letalna doza kristaličnog botulinum toksina tipa A za čovjeka od 70 kg iznosi 0,09–0,15 μg primijenjenog intravenozno ili intramuskularno, 0,70 – 0,90 μg inhalacijski te 70 μg oralno (Arnon i sur., 2001). Godine 1981. prvi je puta demonstrirana učinkovitost botulinum toksina tipa A kod strabizma (Scott, 1981.). Nakon toga, botulinum toksin je odobren za liječenje brojnih poremećaja karakteriziranih pojačanom mišićnom kontrakcijom, ali i za druga stanja, poput autonomnih poremećaja i kronične boli. Najraširenija je primjena botulinum toksina tipa A u kozmetičke svrhe za ravnanje bora. (Nigam i Nigam, 2010).

1.1.1 Struktura botulinum toksina tipa A

Botulinum toksin A (BT-A) je neurotoksin molekulske mase 900 kDa. Sintetiziran je kao jednolančani polipeptid (150 kDa) koji je povezan s netoksičnim proteinima. Uloga netoksičnih proteina je stabilizacija i zaštita neurotoksina od proteolize. BT-A se sastoji od teškog lanca (~100 kDa) vezanog preko jedne disulfidne Cys-Cys veze za laki lanac (~50 kDa). Teški se lanac sastoji od dvije domene od po ~50 kDa (Slika 1). C-terminalna domena je potrebna za visokoafinitetno vezanje toksina za neuron, a N-terminalna domena je

vjerojatno uključena u membransku translokaciju toksina. Laki lanac ima o cinku ovisnu endoproteaznu aktivnost i cijepa protein SNAP-25 čime sprječava oslobađanje acetilkolina iz vezikule presinaptičkog neurona (Dickerson i sur., 2014, Brian, 2009.)



Slika 1. Struktura botulinum toksina tipa A: a) shematski prikaz dvolančane strukture botulinum toksina tipa A b) kvaterna struktura botulinum toksina tipa A

(prilagođeno prema: a) http://www.ebi.ac.uk/biomodels-main/ b) https://www.drugbank.ca/drugs/)

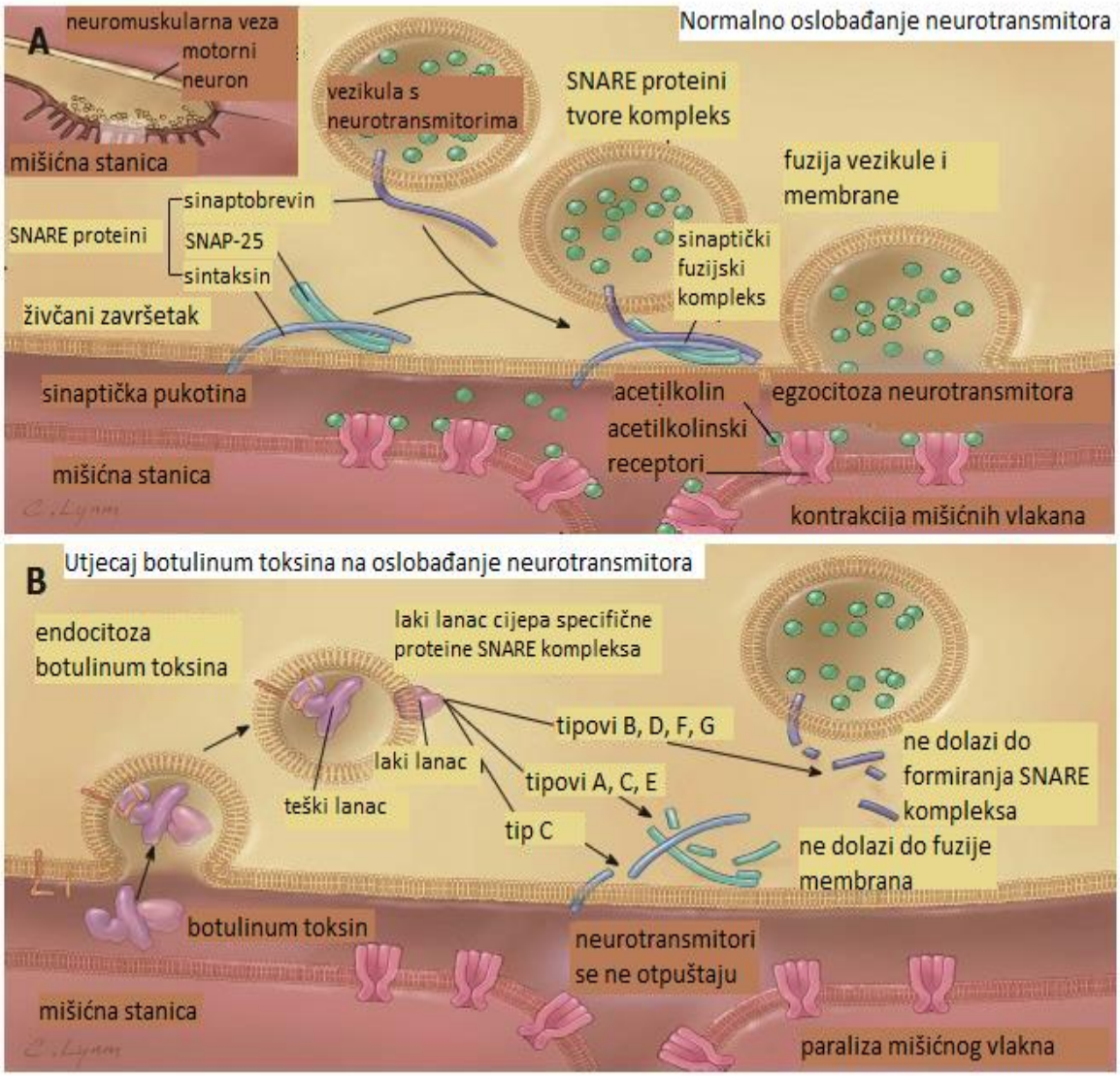
1.1.2 Mehanizam djelovanja botulinum toksina

Svi serotipovi botulinum toksina ometaju prijenos živčanog signala blokirajući oslobađanje acetilkolina, glavnog neurotransmitora na neuromuskularnom spoju. Intramuskularna primjena botulinum toksina djeluje na neuromuskularnu ploču uzrokujući paralizu mišića inhibicijom oslobađanja acetilkolina iz presinaptičkih motoričkih neurona. Botulinum toksini djeluju na četiri različita mjesta u tijelu: neuromuskularnu ploču, autonomne ganglije, postganglijski parasimpatički živčani završetak i postganglijski simpatički živčani završetak koji otpušta acetilkolin (Nigam i Nigam, 2010).

Nakon depolarizacije živčanog završetka motoneurona dolazi do otpuštanja acetilkolina u sinaptičku pukotinu. To je oslobađanje posredovano transportnim proteinskim lancem, kompleksom SNARE (*engl. soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*). Djelovanje BT-A može se podijeliti u nekoliko koraka. Nakon aplikacije BT-A u ciljano tkivo, teški se lanac toksina sa svojim C-terminalnim krajem veže za visokoafinitetne receptore, glikoproteinske strukture koje se specifično nalaze na kolinergičkim živčanim završecima. Ta specifičnost odgovorna je za selektivnost BT-A prema kolinergičkim

sinapsama (Dressler i Adib Saber, 2005.) Sljedeći korak je internalizacija toksina putem endocitoze. Zatim dolazi do translokacije lakog lanca preko membrane endosoma kroz kanal, a posredovana je N-terminalnim krajem teškog lanca. Proces je moguć zbog niskog pH endosoma koji pogoduje promjeni strukture toksina, njegovu ugradnju u membranu endosoma te redukciju disulfidne veze, odnosno odvajanje lakog i teškog lanca. U završnom koraku laki lanac, koji je o cinku ovisna endopeptidaza, cijepa protein SNAP-25 (*engl., SyNaptosomal Associated Protein,* molekulske mase 25 kDa). Djelovanje lakog lanca na SNARE komponente razlikuje se između sojeva botulinum toksina (Slika 2). Tako botulinum toksin tipa A cijepa SNAP-25 na način da mu uklanja 9 aminokiselina s C-terminalnog kraja, dok serotip E cijepa 26 aminokiselina s C-kraja. Laki lanci ostalih botulinum toksina mogu cijepati sintaksin (C_1) i sinaptobrevin (B, D, F i G) na različitim mjestima unutar lanca. Zbog te hidrolize komponenti kompleksa SNARE onemogućena je fuzija vezikule neurotransmitora i presinaptičke membrane, odnosno egzocitoza acetilkolina, a zbog razlike u mjestu djelovanja različitih serotipova toksina, različito je i trajanje blokade te posljedično klinička primjena toksina. Proteolitička aktivnost BT-A traje preko 31 dan, dok ostali serotipovi imaju kraće djelovanje. Djelovanje je serotipa C_1 25 dana, serotipa B 10 dana, F 2 dana, a serotipa E kraće od jednog dana. Dulje djelovanje BT-A omogućuje manje učestalu primjenu toksina (Brian, 2009).

Blokada kolinergičkih živaca dovodi do posljedičnog remodeliranja neuromuskularne veze i stvaranja novih funkcionalnih ogranaka motoneurona koji preuzimaju ulogu egzocitoze acetilkolina. Originalne se okončine i sinapse s vremenom regeneriraju, a novonastale okončine nakon toga propadaju (Brian, 2009). Taj proces obnove funkcije egzocitoze originalnih okončina traje 3 mjeseca nakon intramuskularne primjene BT-A, nakon koliko se primjećuje i obnova mišićne funkcije (Jankovic, 2004). Ovisno o ciljanom tkivu, BT-A može blokirati oslobađanje ACh i na autonomnoj neuroefektornoj ploči žlijezda znojnica, suznih žlijezda, žlijezda slinovnica i glatkih mišića, što ga čini prikladnim za upotrebu u kliničkim stanjima povezanim s navedenim tkivima i organima (Brian, 2009).



Slika 2. Mehanizam djelovanja botulinum toksina. A) Prikaz normalnog otpuštanja neurotransmitora B) Prikaz utjecaja različitih tipova botulinum toksina na SNARE proteine i posljedičnu blokadu otpuštanja neurotransmitora iz presinaptičkog neurona (prilagođeno prema Arnon i sur., 2001)

1.1.3 Klinička primjena bolutinum toksina

Terapijsku primjenu BT-A prvi je puta odobrila Američka agencija za hranu i lijekove (engl. Food and Drug Administration, FDA) kao lijek siroće za liječenje strabizma, hemifacijalnog spazma i blefarospazma. Trgovački naziv prvog komercijalnog pripravka bio je Botox®. Danas se koristi u gotovo svakoj grani medicine. Godine 2002. FDA je odobrila Botox® za kozmetičku primjenu za privremeno reduciranje bora (Nigam i Nigam, 2010).

Nakon intramuskularne primjene učinak počinje nakon 24-72 sata. Dolazi do reverzibilne paralize s vrhuncem djelovanja nakon četiri do sedam dana od injiciranja. Djelovanje BT-A na transmisiju alfa motoneurona iskorišteno je za liječenje distonija, a zbog učinka i na blokadu oslobađanja Ach parasimpatičkih i kolinergičkih postganglijskih simpatičkih neurona koristi se u terapiji pretjerane aktivnosti glatkih mišića, kao što je ahalazija ili kod pretjerane aktivnosti žlijezda, na primjer hiperhidroze (Münchau i Bhatia, 2000). Indiciran je još i za liječenje neuroloških poremećaja: fokalnog spaciteta pedijatrijskih bolesnika s cerebralnom paralizom i u odraslih, cervikalne distonije (tortikolisa), za smanjenje frekvencije i smanjenje simptoma kod kronične migrene, za liječenje poremećaja mokraćnog mjehura: idiopatske prekomjerne aktivnosti mokraćnog mjehura sa simptomima urinarne inkontinencije (www.almp.hr).

Doze svih komercijalno dostupnih botulinum toksina se izražavaju u internacionalnim jedinicama (i.j.). Jedna i.j. botulinum toksina odgovara količini toksina koja nakon intraperitonealne primjene uzrokuje smrt 50% ženskih Swiss-Webster miševa (LD_{50}) (Hoffman i Helveston, 1986).

U terapiji se danas koriste serotip A i B botulinum toksina. BT-A se na tržištu nalazi kao onabotulinumtoxin-A (BOTOX®, Vistabel®, Allergan), abobotulinumtoxin-A (Dysport®, Ipsen), incobotulinumtoxin-A (Xeomin®, Merz Pharmaceuticals), CS-BOT (Chiba Serum Institute, Japan) i kineski BTX-A (Prosigne®; Lanzhou Biological Products Institute), a BT-B kao Neurobloc® i rimabotulinumtoxin B (Myobloc®). Pripravci se razlikuju po potentnosti. U Hrvatskoj je prvi odobren BT-A (Dysport®) 2005., a danas se na hrvatskom tržištu nalaze Botox®, Vistabel® i Xeomin®.

Istražuje se mogućnost primjene BT-A i u drugim indikacijama, a jedna od njih je bol.

1.2 Bol

Prema Internacionalnom udruženju za istraživanje boli (*engl., IASP – International Association for the Study of Pain*) bol je neugodno senzorno i emocionalno iskustvo povezano sa stvarnom ili mogućom ozljedom tkiva i uvijek je subjektivna (https://www.iasp-pain.org). Osim što je pokazatelj patoloških stanja u tijelu, bol je ujedno i zaštitni mehanizam koji nizom promjena u perifernom i/ili središnjem živčanom sustavu pridonosi otklanjanju bolnog podražaja. Iako je subjektivnog karaktera, bol je moguće nizom karakteristika objektivizirati i razvrstati na više načina:

(i) prema porijeklu na kutanu, viscelarnu, mišićnu itd.

(ii) prema duljini trajanja na akutnu (npr. upala, kolike) i kroničnu (npr. reumatoidni artritis, glavobolja, mišično-koštana bol)

(iii) prema mehanizmu nastanka, patofiziološkim karakteristikama i trajanju može još podjeliti na nociceptivnu, upalnu i neuropatsku bol

(iv) prema intenzitetu na blagu do umjerenu, umjereno jaku i vrlo jaku. Ova se klasifikacija koristi u algoritmu liječenja boli prema trostupanjskoj ljestvici Svjetske zdravstvene organizacije (http://www.paineurope.com).

Nociceptivna bol djeluje kao rani sustav upozorenja organizma na moguću ozljedu tkiva. Nastaje uslijed djelovanja podražaja visokog intenziteta na periferne nociceptore. Akutni bolni podražaj termalnog (>47 °C), mehaničkog ili kemijskog karaktera aktivira specifične receptore (npr. vaniloidne TRPV1 receptore) ili ionske kanale (npr. na kiselinu osjetljive ionske kanale - ASIC) na perifernim živčanim završecima C- i Aδ-vlakana. Podražaj TRPV1 receptora dovodi do lokalnog lučenja glutamata iz perifernih okončina koji djeluje preko AMPA (AMPA – α-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kiselina; odgovorni za brzu sinaptičku transmisiju), NMDA (NMDA – N-metil-D-aspartat) i kainatnih receptora doprinoseći nocicepciji. Nastali akcijski potencijal se prenosi u kralježničku moždinu gdje se aktiviraju sljedeći neuroni u osjetnom putu. Ako je podražaj dovoljnog intenziteta, luči se i spori neurotransmitor SP (SP – supstancija P) koji djeluje preko neurokininskih NK1 receptora i pojačava postsinaptičku ekscitaciju spinalnih neurona. Aksoni tih neurona uzlaze u više centre, tj. talamus na suprotnoj strani (spinotalamički trakt) i somatosenzorni korteks, ventralnu medijalnu jezgru hipokampusa i središnju jezgru amigdale.

Upalna bol nastaje kao posljedica upale ili ozljede tkiva. Periferno se iz stanica oko nociceptora (na primjer, trombocita, mastocita, leukocita, fibroblasta) luče kinini, serotonin, eikosanoidi, citokini i drugi upalni medijatori. Aktivacijom nociceptora luče se SP i CGRP

(*engl., calcitonin gene-related peptide*; peptid srodan peptidu kalcitoninskog gena). SP dovodi do vazodilatacije, a CGRP povećava kapilarnu permeabilnost na mjestu upale. Neki medijatori upale, kao serotonin, ATP i vodikovi ioni, djeluju izravno aktivirajući nociceptore dok drugi djeluju neizravno. Posljedično se smanjuje prag aktivacije nociceptora, a podražljivost se membrane aferentnog završetka povećava. To je stanje periferne senzitizacije.

Tijekom učestalog izbijanja primarnih aferentnih neurona dolazi i do središnje senzitizacije kao i do promjena u transkripciji gena za različite molekule uključene u proces nocicepcije. Može doći i do promjene fenotipa u Aβ-vlaknima koja zatim poprimaju neke karakteristike C-vlakana, kao što je ekspresija SP, te počinju prenositi bolne impulse.

Smatra se da kao posljedica ovakvih promjena nastaju stanja povećane osjetljivosti na bolne podražaje (hiperalgezija), ali i na podražaje koji inače nisu bolni (alodinija).

Neuropatska bol nastaje kao posljedica ozljede ili disfunkcije perifernog živčanog sustava i/ili SŽS-a npr. u dijabetesu, kroničnom alkoholizmu, HIV-infekciji, ozljedi kralježničke moždine i sl. Patofiziologija neuropatske boli je vrlo složena, a uključuje brojne patološke promjene na periferiji, tj. mjestu ozljede živca, kao i na spinalnoj te supraspinalnoj razini (Bach-Rojecky, 2006).

1.2.1 Receptori i signalni putovi u prijenosu bolnih signala

Receptori za bol u koži i drugim tkivima su svi slobodni živčani završeci. Oni su rasprostranjeni u površinskim slojevima kože, kao i u određenim unutarnjim tkivima, kao što su periosteum, arterijski zidovi, zglobne površine, te falks i tentorij u lubanjskom svodu. Većina drugih dubokih tkiva slabo su opskrbljeni živčanim završecima. Štoviše, svako veće oštećenje tkiva može uzrokovati sporu kroničnu bol u tom području (Guyton i Hall, 2011). Za razliku od većine drugih senzornih receptora u tijelu, receptori za bol prilagođavaju se vrlo malo, a ponekad uopće ne. Zapravo, u određenim uvjetima, ekscitacija vlakana koji prenose bol postupno postaje sve veća kako se bolna stimulacija nastavlja, pogotovo za sporu bol. Ovo povećanje osjetljivosti receptora boli dovodi do hiperalgezije.

Iako su svi receptori za bol slobodni živčani završeci, ti završetci koriste dva odvojena puta za prijenos signala u središnji živčani sustav – putem brzih i sporih vlakana. Dva puta uglavnom odgovaraju dvama tipovima boli - brzom putu boli i sporim, kroničnim putovima boli. Brza (oštra, akutna ili električna) bol osjeća se 0,1 sekundu nakon bolne stimulacije, dok spora bol

počinje tek nakon 1 sekunde ili kasnije, a intenzitet joj se s vremenom pojačava. Oštra se bol javlja nakon npr. uboda igle u kožu, toplinskog (>45°C) ili električnog šoka i ne osjeća se u dubokim tkivima. Spora (tupa, kronična) bol osjeća se i u dubljim tkivima i organima, a obično se javlja nakon destrukcije tkiva dugotrajnim mehaničkim ili toplinskim podražajima te nakon kemijskih bolnih podražaja. Brzi bolni signali prenose se perifernim živcima u kralježničku moždinu kroz dorzalne spinalne rogove putem Aδ vlakna, a spori putem C vlakana. Od kralježničke moždine do mozga bolni signali mogu proći neospinotalamičkim putom ili paleospinotalaničkim putom. Neospinotalamični put prenosi brzu bol Aδ-vlaknima koja završavaju u lamini I stražnjih rogova. Vlakna pobuđuju neurone drugoga reda koji prednjom komisurom prelaze na suprotnu stranu kralježničke moždine i anterolateralnim kolumnama završavaju u mozgu. Završetak neospinotalamičnog puta je u retikularnim područjima moždanog debla i talamusu. Paleospinotalamični put je prenositelj spore boli nošene C-vlaknima koja završavaju u želatinoznoj tvari kralježnične moždine (lamine II i III). Neuroni drugoga reda se združuju s vlaknima brzog puta i signali se anterolateralnim putem suprotne strane kralježnične moždine prenose do talamusa i drugih područja (npr. tektalno područje mezencefalona, sivo područje oko akvedukta te retikularne jezgre produljene moždine, ponsa i mezencefalona) (Guyton i Hall, 2011).

1.2.2 Važni neurotransmitori pri nocicepciji

Glutamat je glavni ekscitacijski neurotransmitor u svim neuronima u osjetnom putu. Djeluje preko ionotropnih AMPA i NMDA receptora na perifernim okončinama aferentnih živaca, neuronima dorzalnog roga kralježničke moždine i neuronima u talamusu (Carlton, 2001; Milan, 1999). Luči se na periferiji nakon aktivacije nociceptora termalnim podražajem ili kapsaicinom, a nocicepciji doprinosi djelovanjem na receptore na aferentnim završecima nemijeliniziranih C-vlakana. Pri upali se pojačano izlučuje iz nociceptora i iz okolnih dermalnih i epidermalnih stanica, makrofaga ili Schwannovih stanica te na taj način doprinosi povećanoj podražljivosti neurona.

Osim glutamata, periferno se pri upali oslobađaju i neuropeptidi: SP i CGRP koji imaju važne autokrine i parakrine učinke. Glutamat osim postsinaptički djeluje i presinaptički na NMDA receptore na membranama središnjih grana aferentnog senzornog vlakna u dorzalnom rogu kralježničke moždine. Posljedično, dolazi do povećanja lučenja neurotransmitora u središnje sinapse (Milan, 1999). Važni prijenosnici bolnih impulsa su: SP i drugi tahikinini, CGRP,

somatostatin, faktor lučenja kortikotropina, kolecitokinin, galanin, vazoaktivni intestinalni peptid (VIP), a oslobađaju se iz središnjih okončina aferentnog senzornog vlakna. Medijatori iz ne-živčanih izvora u dorzalnom rogu kralježničke moždine: adenozin tri-fosfat (ATP), dušikov (II) oksid (NO), prostaglandini i različiti neurotropini mogu djelovati sinergistički ekscitacijski ili mogu djelovati inhibicijski. Ekscitacijski djeluju glutamat, SP, neurotenzini, VIP. Inhibicijski interneuroni su kolinergički, opioidni i oni koji djeluju preko GABA-e (γ-amino maslačne kiseline). Serotonin se luči na okončinama neurona koji polaze iz rafe jezgara moždanog debla prema različitim dijelovima mozga i kralježničke moždine, osobito prema dorzalnim rogovima leđne moždine i hipotalamusu, a djeluje kao inhibitor putova bolnih signala u kralježničkoj moždini (Guyton i Hall, 2011).

1.2.3 Periferna i središnja senzitizacija

Dok kod drugih osjetnih stanica dugotrajniji podražaji uzrokuju njihovu prilagodbu i smanjenu podražljivost, kod senzornih neurona koji prenose bolne impulse to nije slučaj. Dugotrajnim podraživanjem nociceptora bol se pojačava i iz akutne prelazi u kroničnu. Periferna i središnja senzitizacija karakteriziraju upalnu i neuropatsku vrstu boli.

Periferna senzitizacija je stanje povećane podražljivosti nociceptora. Periferno oslobođeni medijatori upale vežu se za metabotropne receptore koji su spregnuti s G-proteinima na membranama perifernih aferentnih završetaka. Oni dovode do aktivacije protein kinaza A i C koje fosforiliraju ionske kanale i receptore te se smanjuju pragovi aktivacije receptora i ionskih kanala, npr. TRPV1 receptora na termalni podražaj, ASIC ionskih kanala na vodikove ione i dr.

Središnja senzitizacija, tj. povećana podražljivost neurona drugog reda u dorzalnom rogu kralješnične moždine, uključuje različite i vrlo kompleksne promjene u kralješničnoj moždini, a nastaje kao posljedica periferne sensitizacije i učestalog ulaza informacija s periferije. Središnja sensitizacija može biti brza i odgođena (Bach-Rojecky, 2006). Brza senzitizacija nastaje uslijed lučenja glutamata i neuropeptida iz središnjih aksona primarnog neurona. Uloga glutamata u procesu središnje senzitizacije je posebno važna i vrlo kompleksna (Jones i Sorkin, 2001; Ji i Woolf, 2001). Glija stanice dorzalnog roga kralješnične moždine također mogu biti važne u procesu središnje senzitizacije, a mogu se aktivirati glutamatom, SP, NO i prostaglandinima. Odgođena središnja senzitizacija nastaje kao posljedica transkripcijskih promjena u neuronima dorzalnog roga kralješnične moždine. Dolazi do povećane ekspresije

gena, poput onih za c-fos i ciklooksigenazu$_2$ (COX_2). Posljedica je povećana sinteza prostaglandina koji djeluju ekscitacijski postsinaptički i presinaptički (Bach-Rojecky, 2006).

1.2.4 Supresija boli u mozgu i kralježničkoj moždini

Mozak sam može suprimirati bolne impulse aktivirajući putove za kontrolu boli što se naziva analgetski sustav mozga. Analgetski sustav mozga sastoji se od tri glavne komponente:

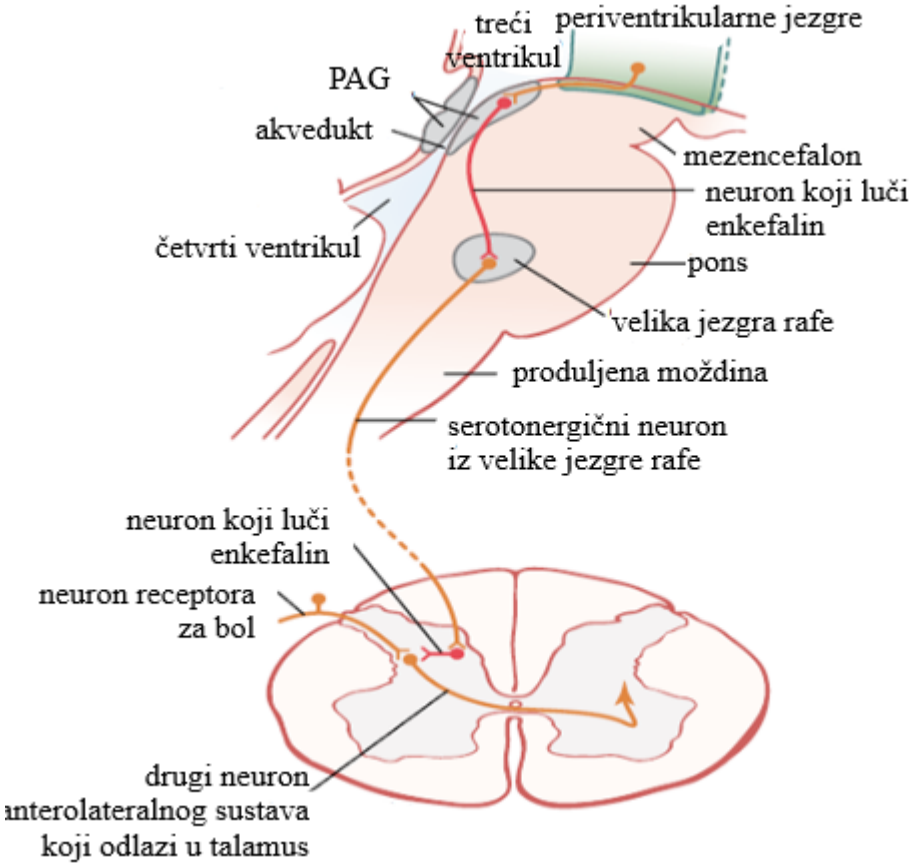
(i) Periakveduktalna siva tvar (PAG, engl. *periaqueductal gray matter*) i periventrikularna područja mezencefalona i gornjeg ponsa. Neuroni iz tog područja šalju signale u

(ii) veliku jezgru rafe koja je smještena između donjeg dijela ponsa i gornjeg dijela produžene moždine te u retikularnu paragigantocelularnu jezgru u lateralnom dijelu produljene moždine. Iz tih se jezgara signali spuštaju neuronima drugog reda do

(iii) kompleksa za inhibiciju boli koji se nalazi u stražnjim rogovima kralješničke moždine.

Ovdje analgetski signali mogu blokirati bol prije nego dođe do mozga. Električna stimulacija u PAG-u ili velikoj jezgri rafe mogu suprimirati mnoge jake bolne signale koji ulaze putem dorzalih korijena kralježničke moždine. Također, stimulacija područja na još višim razinama mozga koji ekscitiraju PAG područje također može potisnuti bol (slika 3).

Nekoliko je neurotransmitora uključeno u analgetski sustav, a najvažniji su enkefalini i serotonin. Mnoga živčana vlakna iz periventrikularne jezgre i PAG-a luče enkefalin iz svojih okončina. Završetci mnogih vlakana u velikoj jezgri rafe nakon podraživanja oslobađaju enkefaline. Lučenje serotonina u stražnjim rogovima kralješničke moždine potiče lokalne moždinske neurone na lučenje enkefalina koji uzrokuju presinaptičku i postsinaptičku inhibiciju ulaznih vlakana za bol koja se prenosi vlaknima C i Aδ tipa. Na tom mjestu analgetski sustav zaustavlja bolne signale prije nego što se prekopčaju i krenu prema mozgu (Guyton i Hall, 2011).



Slika 3. Analgetski sustav mozga i kralježničke moždine. Prikazana je inhibicija dolazećeg bolnog signala na razini moždine i prisutnost neurona koji luče enkefaline koji suprimiraju bolne signale u moždini i moždanom deblu.

(modificirano prema Guyton i Hall, 2011)

U kralješničnoj moždini se nalaze ekscitacijski i inhibicijski interneuroni koji imaju važnu ulogu u regulaciji nociceptivne transmisije. Oni mogu izravno djelovati postsinaptički na neurone u dorzalnom rogu kralješnične moždine ili presinaptički na središnje aferentne završetke.

1.2.5 Mehanizam antinociceptivnog djelovanja botulinum toksina

Prva ispitivanja antinociceptivnog djelovanja BT-A provedena su formalinskim testom na štakorima. U tom je modelu BT-A nakon periferne subkutane primjene u šapu štakora smanjio edem i bol u drugoj fazi testa, nakon pojave upale, kao i periferno lučenje glutamata (Aoki, 2005; Cui i sur., 2004). Izmjereno je i smanjenje imunoreaktivnosti c-Fos proteina kojom se prati aktivacija neurona u dorzalnom rogu kralješničke moždine (Aoki, 2005). Iz tih

je rezultata zaključeno da BT-A primijenjen s.c. inhibira lučenje neurotransmitiora koji uzrokuju bol i upalu iz perifernih osjetnih neurona te tako inhibira perifernu senzitizaciju, što dovodi do posredne inhibicije središnje senzitizacije (Aoki, 2005; Cui i sur., 2004).

U eksperimentalnom modelu karagenanom i kapsaicinom uzrokovane upalne boli pokazano je da antinociceptivni i protuupalni učinci BT-A nisu povezani, što je dovelo u pitanje periferni mehanizam djelovanja BT-A (Bach-Rojecky i sur., 2008).

Na modelu „zrcalne“ boli središnjeg porijekla pokazano je središnje analgetsko djelovanje BT-A. Bilateralna bol uzrokovana injiciranjem kisele fiziološke otopine (pH 4,0) je središnjeg podrijetla te je u tom modelu, pokazano da nakon periferne primjene u šapu štakora BT-A smanjuje bol na strani ozljede (ipsilateralno), kao i na suprotnoj strani (kontralateralno), što ukazuje na njegovo središnje mjesto djelovanje, suprotno do tada općeprihvaćenoj hipotezi o perifernom mjestu djelovanja BT-A. Također, primjenom blokatora aksonalnog transporta, kolhicina inhibirano je djelovanje periferno primijenjenog BT-A ipsilateralno i kontralateralno, na temelju čega je pretpostavljeno da je za djelovanje BT-A potreban retrogradni aksonalni transport (Bach-Rojecky i Lacković, 2009). Teoriji o središnjem djelovanju BT-A doprinosi i istraživanje utjecaja BT-A na neuropatsku bol u kojem je na modelu dijabetičke neuropatske boli primjećeno bilateralno smanjenje boli nakon unilateralne primjene BT-A (Bach-Rojecky, 2010). Teoriju o aksonalnom transportu BT-A potvrđuje i imunohistokemijski nalaz pocijepanog SNAP-25 na kontralateralnom dijelu hipokampusa nakon unilateralne primjene BT-A (Antonucci, 2008). Pocijepani SNAP-25 proteini kasnije su biokemijskim i imunohistokemijskim metodama pronađeni i u senzornim nociceptivnim jezgrama nakon periferne primjene BT-A (Matak i sur., 2011).

Provedeno je i nekoliko istraživanja koja su željela ispitati povezanost djelovanja BT-A s opioidnim i GABA sustavom kao sustavima koji sudjeluju u modulaciji bolnih impulsa u središnjem živčanom sustavu. Pokazan je sinergistički učinak morfina i BT-A na modelu upalne boli uzrokovane formalinom te neuropatske boli izazvane ozljedom živca. Pokazano je i da prethodna primjena BT-A smanjuje toleranciju na morfin što ukazuju na to da bi antinociceptivno djelovanje BT-A moglo biti povezano s endogenim opioidnim sustavom (Vacca i sur., 2012; Vacca i sur., 2013). Istraživanja dokazuju i da je aktivnost BT-A u akutnoj upalnoj boli i kroničkoj neuropatskoj boli, a moguće i drugim tipovima boli, povezana s μ-opioidnim receptorima (Drinovac i sur., 2013a), a postoje i pretpostavke kako ulogu u stimulaciji μ-opioidnih receptora ima i inhibicijski sustav GABA-e (Drinovac i sur., 2013b).

Točan mehanizam antinociceptivnog djelovanja BT-A nije u potpunosti razjašnjen, kako njegovo djelovanje na senzorne neurone, tako i njegov učinak na aktivaciju neurona u višim

supraspinalnim regijama za koje se smatra da se aktiviraju u procesu nocicepcije te su potrebna dodatna istraživanja.

1.3 c-Fos kao neuralni marker boli

C-Fos, protein protoonkogena *c-fos*, opsežno se koristi kao marker za aktivaciju nociceptivnih neurona u kralježničnoj moždini duže od dvadeset godina otkad su Hunt i sur. prvi izvjestili 1987. godine da periferna bolna stimulacija stražnje šape štakora dovodi do značajne indukcije c-Fos u površinskim i dubokim laminama dorzalnih rogova. Protoonkogen *c-fos* može se inducirati u stanici nekoliko minuta nakon aktivacije receptora neurotransmitorima, stoga se naziva neposredni rani gen. Kao proizvod *c-fos* gena, c-Fos protein može formirati kompleks s Jun-om, još jednim onkogen proteinom, a ovaj kompleks se veže na AP-1 mjesto DNA i potiče transkripcije gena. Stoga je c-Fos uključen u kaskadu prijenosa signala koji povezuje izvanstanične događaje s unutarstaničnim adaptacijama (Rauscher i sur., 1988; Naranjo i sur. 1991). Ekspresija gena se uglavnom mjeri Northern blot analizom ili *in* situ hibridizacijom, dok se protein uglavnom vizualizira korištenjem imunohistokemijskih tehnika (Harris, 1998).

Pinto i sur. (2007) su proučavali ekspresiju c-Fos-a i na supraspinalnoj razini na modelu upalne boli. Kronična upalna bol uzrokuje kratkoročne i dugoročne središnje promjene, koje su uglavnom proučavane na razini kralježnične moždine. Supraspinalni centri za kontrolu boli također se aktiviraju uslijed kronične upalne boli. Akutna upala zgloba u životinja izazvala je rano i kasno povećanje ekspresije *c-fos* na razini kralježničke moždine, a kasnije i povećanje ekspresije supraspinalno. Supraspinalno, bolna stimulacija izazvala je samo kasni porast *c-fos* ekspresije. Dosadašnje studije pokazuju značajne razlike u c-*fos* indukciji između kralježničke moždine i supraspinalnih centara tijekom kronične boli. Također, pokazuju da se neuroni u kralježničkoj moždini i u supraspinalnim regijama razlikuju po sposobnosti za ranu i kasnu bolom izazvanu *c-fos* ekspresiju. Razlike u obrascima neuralne aktivacije se objašnjavaju funkcionalnim promjenama veza između dorzalnih rogova kralježničke moždine i supraspinalnih centara za kontrolu boli (Pinto i sur., 2007).

Baulmann i sur. (1999) u svom su istraživanju ekspresije c-Fos nakon formalinom uzrokovane boli pokazali su aktivaciju c-Fos u nekoliko jezgri mozga (talamusa i hipotalamusa) i moždanog debla povezanih s obradom ili modulacijom nociceptivnih signala, kao što je medijalni talamus i PAG. Aktivacija c-Fos u jezgrama koje predstavljaju veći dio ventralnog

lateralnog septalnog područja, može biti povezana s kontrolom reakcija ponašanja nakon bolne stimulacije (Baulmann i sur., 1999).

Keay i Bandler (1993) su istraživali c-Fos ekspresiju u različitim područjima PAG-a nakon različitih vrsta bolih podražaja. Otkrili su da je kutana bolna stimulacija (proizvedena toplinom) inducirala Fos ekspresiju uglavnom u lateralnim i dorzolateralnim segmentima PAG-a, dok je Fos induciran primjenom razrijeđenog formalina u mišiće vrata pokazao ekspresiju u ventrolateralnom kvadrantu PAG-a.

Korištenje ekspresije c-fos-a kao markera nocicepcije ima brojne prednosti. U usporedbi s ostalim pristupima, omogućuje vizualizaciju lokalizacije populacije neurona koji se aktiviraju u nociceptivnim putovima nakon različitih bolnih stimulacija. Nadalje, c-Fos ekspresija lako se može kvantitativno analizirati jednostavnim brojanjem neurona koji su imunoreaktivno označeni. U odnosu na druge složenije metode, primjerice elektrofiziološko praćenje aktivacije neurona tijekom bolnog podražaja koje zahtijevaju posebnu opremu i uvjete izvođenja, imunohistokemijska karakterizacija c-Fos je jednostavna metoda koja omogućuje i kombiniranje s drugim imunohistokemijskim postupcima.

Međutim, postoje i brojni nedostaci ovog pristupa budući da c-Fos nije specifičan marker aktivacije neurona kod boli. Tako su Presley i sur. (1990) pokazali da disocijaciju između djelovanja velike doze morfina na bol uzrokovanu primjenom formalina u šapu štakora i ekspresije C-Fos koja je ostala nepromijenjena u površinskim laminama kralježničke moždine (Presley i sur., 1990). Slična disocijacija između analgetskog djelovanja i ekspresije c-Fos pokazana je i za kokain (Hamalainen i sur., 1996). Nadalje, u formalinskom testu je pokazano da je ekspresija c-Fos ovisna o koncentraciji primijenjenog formalina, što nije koreliralo s intenzitetom uzrokovane boli u štakora (Harris i sur., 1995). Osim toga, stimulacija mora biti jakog intenziteta i dugotrajna da bi se dobile mjerljive količine Fos ekspresije. Također, različiti neuroni eksprimiraju Fos kod različitog intenziteta podražaja, a i zbog odgođene ekspresije teško je odrediti koja je točno stimulacija izazvala ekspresiju. Temeljem navedenog, kao i brojnih drugih eksperimenata, možemo zaključiti da ekspresija c-Fos nije specifična za bol, već je moguće da se ovaj gen i njegov produkt eksprimiraju pojačano u različitim stanjima i procesima (Harris, 1998).

2 OBRAZLOŽENJE TEME

Antinociceptivno djelovanje BT-A predmet je pretkliničkih i kliničkih istraživanja već više od 10 godina. Do sada je pokazano na različitim eksperimentalnim modelima upalne i neruopatske boli dugotrajno antinociceptivno djelovanje BT-A nakon njegove jednokratne lokalne primjene, što ga razlikuje od svih do sada poznatih analgetika (Bach-Rojecky, 2006). BT-A u nanomolarnim količinama smanjuje patološku bolnu preosjetljivost, dok nema utjecaja na akutne pragove boli, a učinkovita doza ovisna je o mjestu primjene. Tako je pokazano da BT-A djeluje na perifernu bol (u području inervacije *n. ishiadicusa*) kad se primjeni periferno subkutano, ali i intratekalno u nekoliko puta nižoj dozi. Budući da BT-A ne prolazi u središnji živčani sustav difuzijom, niti je do sada pokazan njegov transport putem neurona s periferije do supraspinalnih regija, pretpostavljamo da je njegovo djelovanje na perifernu bol segmentalno, odnosno da ne uključuje više supraspinalne regije koje sudjeluju u modulaciji boli.

Dosadašnjim ispitivanjima antinociceptivnog djelovanja BT-A apliciranog supraspinalno, u cisternu magnu, pokazano je da, za razliku od periferne i intratekalne primjene, BT-A na supraspinalnoj razini ne smanjuje visceralnu (Drinovac i sur., 2014), niti zrcalnu bol (Drinovac i sur., 2016). Premda velik broj rezultata upućuje na središnje mjesto djelovanja, najvjerojatnije na razini dorzalnog roga kralješničke moždine kuda BT-A dolazi aksonalnim transportom s periferije, mehanizam djelovanja BT-A u središnjim sinapsama nije dovoljno jasan, a vjerojatno uključuje modulaciju središnjih inhibicijskih putova. Potrebna su daljnja istraživanja koja bi dala konkretne odgovore i razjasnila mehanizme antinociceptivnog djlovanja BT-A.

Cilj ovog diplomskog rada je istražiti antinociceptivni učinak BT-A nakon njegove primjene u moždane komore na modelu upalne boli (formalinski test) i to promatrajući aktivaciju c-Fos kao markera aktivacije neurona u periakveduktalnoj sivoj tvari, regiji mozga koja ima važnu ulogu u modulaciji nocicepcije.

Ukoliko bi se razjasnio mehanizam središnjeg djelovanja BT-A i to u supraspinalnim centrima, otvorila bi se vrata brojnim daljnjim istraživanjima mehanizama antinocicepcijskog učinka i mogućnosti primjene BT-A.

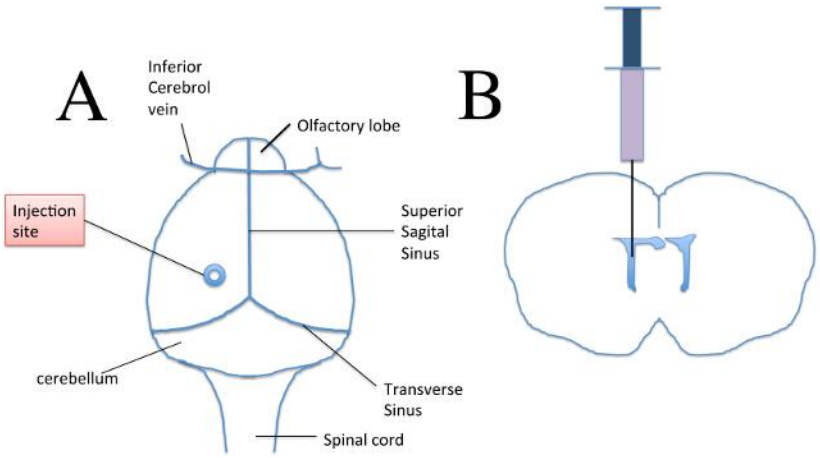
3 MATERIJALI I METODE

3.1 Tkivo

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 bihevioralnih mjerenja, 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 proučavanje boli (International Association for Study of Pain, IASP). Za obavljanje pokusa na projektima, kojih je ovaj diplomski rad dio, dobivena je dozvola Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.1.1 Botulinum toksin A

U pokusu je korišten botulinum toxin A (Botox®, Allergan, SAD). Za dobivanje potrebne doze, BT-a je otopljen u fiziološkoj otopini. Svaka bočica Botox® sadrži je 100 i.j. (~4,8ng) pročišćenog Clostridium botulinum toksina tipa A u obliku liofilizata. Jedna 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. BT-A je u ovom eksperimentu jednoj skupini pokusnih životinja injiciran u 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)

3.2 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 primarni 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).

3.3 Eksperimentalni model boli: formalinski test

Na štakorima je proveden formalinski test tako da im je supkutano, u plantarnu stranu desne stražnje šape injicirano 50 μL 5%-tne otopine formalina. Odmah nakon injiciranja štakori su vraćeni u prozirni kavez na promatranje tijekom sat vremena. Bol je praćena kao broj lizanja i trzanja šape u koju se injicirala otopina formalina. Vrijeme promatranja podijeljeno je u dvije faze: akutna faza I (0–15 min) u kojoj je odgovor je uzrokovan izravnom stimulacijom perifernih živčanih vlakana formalinom i upalna faza II (15–60 min) koja je uzrokovana perifernom senzitizacijom kao posljedicom upale (Bach Rojecky, 2006).

3.4 Eksperimentalni protokol

Eksperiment se sastojao od dvije skupine životinja; jedne, kojoj je 5 dana prije formalinskog testa injiciran BT-A i.c.v i druge – kontrolne, 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 Imunohistokemija

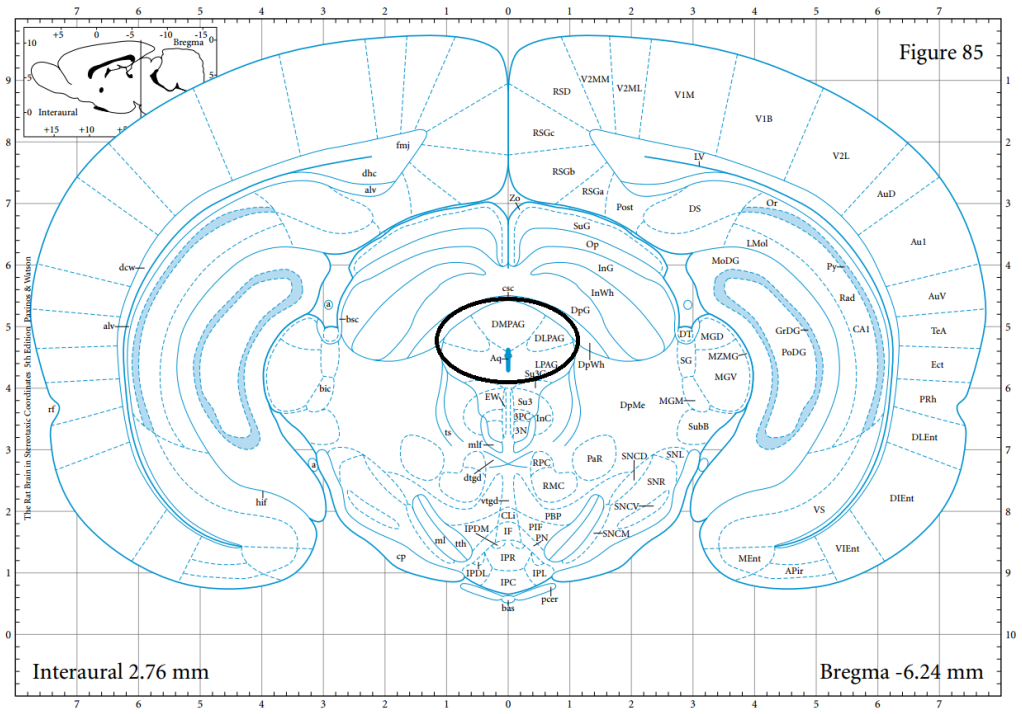
Mozak je uklonjen i čuvan na temperaturi od 4°C preko noći u 10% otopini sukroze u paraformaldehidu, zatim idući dan u 30%-tnoj otopini sukroze u PBS-u te je zatim smrznut na -80°C do uporabe. Smrznuti uzorci izrezani su na kriostatu (Leica, Germany) na prereze debljine 30 μm. Dio mezencefalona koji obuhvaća PAG podvrgnut je imunohistokemijskoj analizi. Uzorci su stavljeni u jažice s PBS-om te su ispirani 3 puta po 5 minuta u 0,25% otopini PBS – TritonX100 (PBST), blokirani 10%-tnim kozjim serumom tijekom 1 h i inkubirani tijekom noći na sobnoj temperaturi sa zečjim anti-c-Fos primarnim protutijelom (1:500) razrijeđenim u 1% kozjem serumu. Sljedeći dan su isprani 3 puta po 5 minuta PBST-om i inkubirani 2 h na sobnoj temperaturi s fluorescentnim sekundarnim mišjim protutijelom Alexa Fluor-448 (1:400), razrijeđenim u 1%-tnom kozjem serumu u tami. Uzorci su opet isprani 3 puta po 5 minuta i potom naneseni na predmetna stakalca. 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. U programu PhotoScape spojeni su dijelovi slika pojedine regije PAG-a te je prilagođen kontrast i svjetlina kako bi se lakše analizirali c-Fos pozitivni neuroni. C-Fos pozitivni neuroni su brojani u 3 nasumična prereza od svake životinje; za svaku je životinju zatim izračunata srednja vrijednost, te je na kraju od srednjih vrijednosti za sve 3 životinje izračunata srednja vrijednost skupine.

3.5 Statistička analiza

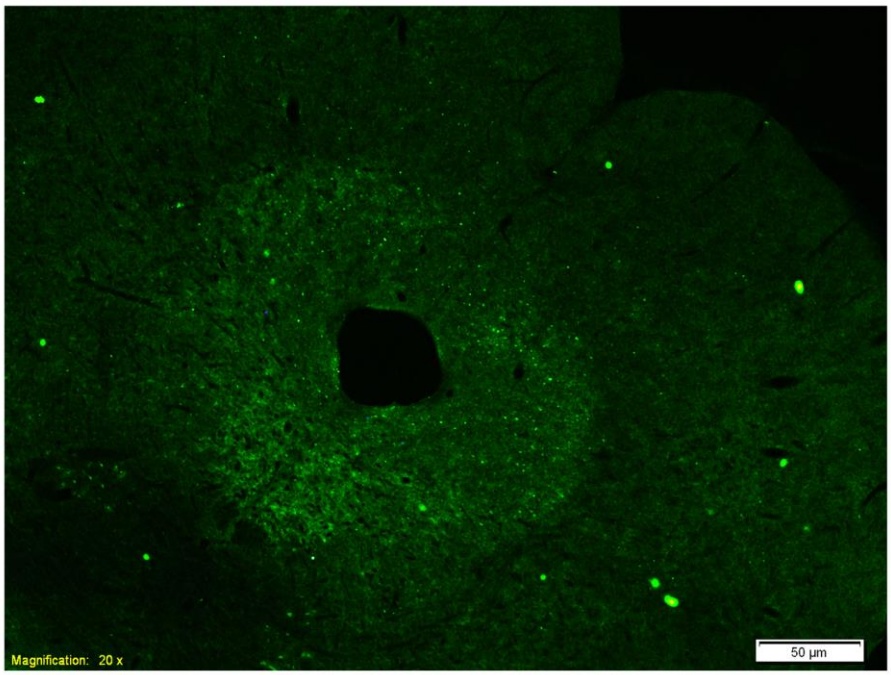
Rezultati pokusa izraženi su kao aritmetička sredina ± standardna pogreška aritmetičke sredine (SEM) i prikazani u obliku grafa sa stupcima. Razlika varijanci analizirana je jednosmjernom analizom (One-way ANOVA) i Tukey HSD testom. Kao statistički značajna vrijednost uzeta je $p< 0.05$.

4 REZULTATI I RASPRAVA

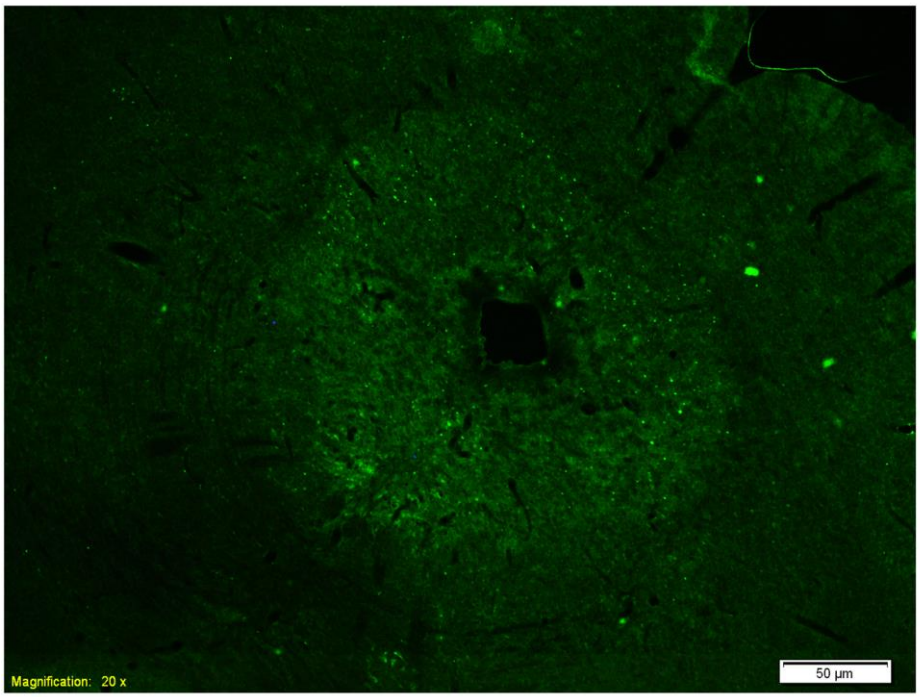
U ovom diplomskom radu ispitan je utjecaj BT-A na aktivaciju neurona u periakveduktalnoj sivoj tvari, regiji mozga za koju se smatra da se aktivira u procesu nocicepcije i to promatrajući ekspresiju c-Fos kao markera aktivacije neurona (Slika 5). Imunohistokemijskom metodom analiziran je broj c-Fos pozitivnih neurona na po 3 nasumično odabrana presjeka mozga koji obuhvaćaju PAG u dvije skupine životinja; ispitivane skupine kojoj je prethodno formalinskom testu injicirana otopina BT-A u moždane komore (i.c.v.) i kontrolne skupine kojoj je umjesto BT-A aplicirana fiziološka otopina i.c.v. (slika 6).



Slika 5. Shematski prikaz poprečnog prereza mozga koji obuhvaća PAG. Prikaz najbolje opisuje odabrane uzorke presjeka mozga (Paxinos i Watson, 2004)



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



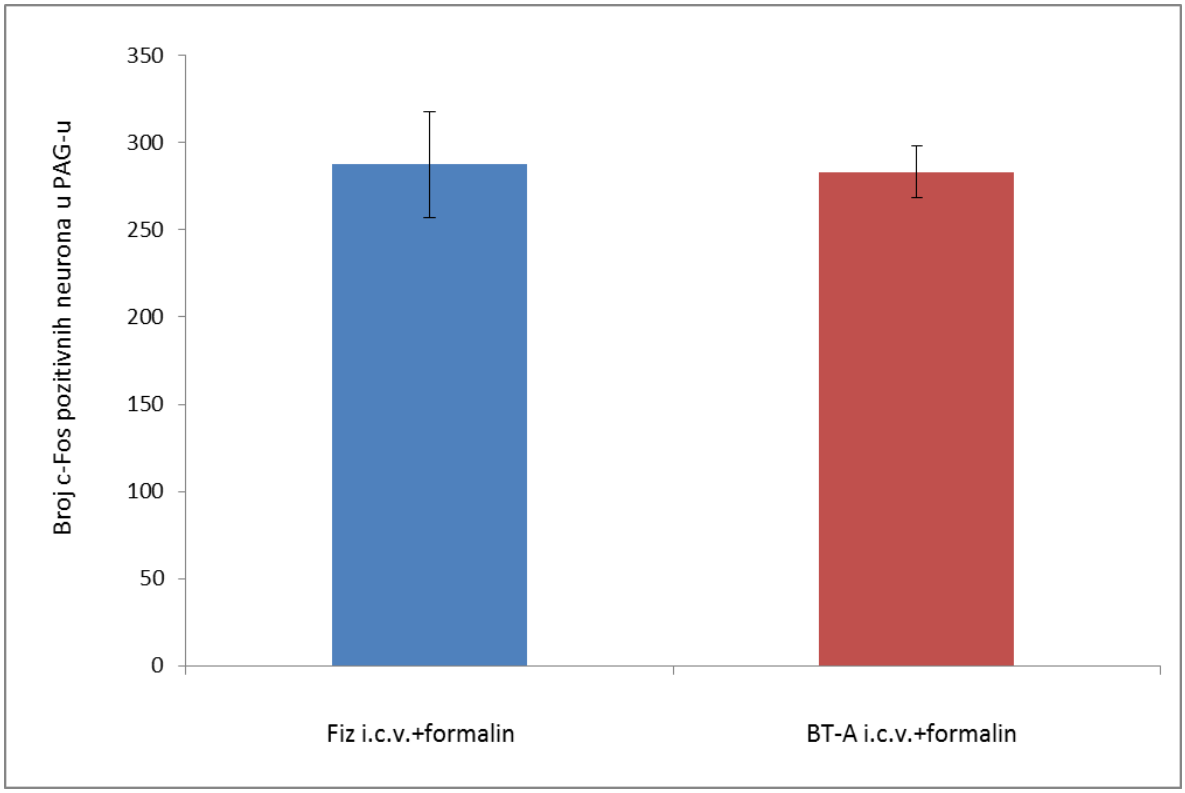
B) BT-A i.c.v. + formalin

Slika 6. Prikaz imunoreaktivnosti c-Fos pozitivnih neurona u poprečnom presjeku mozga koji obuhvaća PAG u A) kontrolnoj i B) ispitivanoj skupini. Skala: 50 µm.

Pomoću programa PhotoScape napravili smo kvantitativnu analizu imunoreaktivnosti sa slika prereza većeg povećanja (20X) (slika 6) kako bismo proveli statističku analizu. Analizirana su po tri prereza svake eksperimentalne životinje te su iz dobivenih rezultata izračunate srednje vrijednosti za svaku životinju. Iz tih je vrijednosti potom izračunata srednja vrijednost skupine. Dobivene srednje vrijednosti skupine, standardna devijacija i SEM su prikazane u Tablici 1 i grafički na slici (Slika 7).

Tablica 1. Utjecaj BT-A na aktivaciju neurona u PAG-u promatrano kao broj c-Fos pozitivnih neurona. Usporedba kontrolne (A) i ispitivane skupine (B)

Skupine	**A) fiziološka otopina i.c.v.+formalin**	**B) BT-A i.c.v.+formalin**
Srednja vrijednost	287,6667	283,1111
SD (+/-)	52,5769	25,6955
SEM (+/-)	30,3553	14,8353



Slika 7. Grafički prikaz utjecaja BT-A na aktivaciju neurona u PAG-u promatrano kao broj c-Fos pozitivnih neurona. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost c-Fos pozitivnih neurona u PAG-u +/- SEM

Antinociceptivni učinak BT-A dosad je pokazan na nekoliko patofiziološki različitih vrsta boli i uslijed različitih mjesta i načina primjene, periferno supkutano i središnje intratekalno. Luvisetto i suradnici (2006) prvi su demonstrirali antinociceptivni učinak BT-A nakon središnje (intracerebroventrikularne) injekcije male doze BT-A u formalinskom testu kod miševa, čime je po prvi puta predloženo središnje mjesto njegova djelovanja na bol.

Temeljeno na brojnim pretkliničkim nalazima, nakon primjene u spinalni kanal (intratekalno) BT-A u dozi od 1 i.j./kg značajno smanjuje upalnu bol uzrokovanu formalinom, kao i hiperosjetljivost na mehanički podražaj u modelu periferne neuropatije, dijabetičke neuropatije, upalnog peritonitisa te zrcalne boli središnjeg porijekla. Pri tome, za razliku od perifernog supkutanog injiciranja, intratekalno primijenjeni BT-A djeluje u nekoliko puta nižoj dozi, učinak nastupa unutar 24 sata te traje duže (Bach-Rojecky, 2006).

O kompleksnom djelovanju BT-A na bol govore i nedavni rezultati Drinovac i sur. (2016) koji su istražili porijeklo i mehanizam bilateralne antinociceptivne aktivnosti BT-A u modelu zrcalne boli inducirane 3%-tnom intramuskularnom injekcijom karagenana u Wistar štakora. U tom je istraživanju BT-A primijenjen periferno, u ipsilateralnu ili kontralateralnu šapu

(i.pl.) te intratekalno (i.t.) i supraspinalno (intracisternalno, i.c.) u cisternu magnu. Ipsilateralni i.pl. i i.t. BT-A je smanjio bilateralnu mehaničku osjetljivost, dok kontralateralni i.pl. i i.c. tretmani nisu imali nikakvog učinka. Bilateralni antinociceptivni učinak ipsilateralnog i.pl. BT-A je spriječen intreteklanom, ali ne i supraspinalnom (i.c.v. ili i.c.) primjenom μ-opioidnog antagonista naloksonazina i GABA antagonista bikukulina.

Zanimljivo je da do aktivacije c-Fos proteina u dorzalnom rogu kralježnične moždine dolazi u različitim modelima boli te da BT-A bilo da je primijenjen periferno ili središnje u spinalni kanal, tu aktivaciju značajno smanjuje. Time je zaključeno da mjesto djelovanja BT-A na bol perifernog porijekla uključuje kralježničnu moždinu.

U pokusu u okviru ovog diplomskog rada, koji je nastavak na bihevioralna istraživanja, pokazali smo da BT-A primijenjen u moždane komore ne utječe na ekspresiju c-Fos proteina u periakveduktalnoj sivoj tvari mezencefalona koja zauzima značajno mjesto u modulaciji nocicepcije na supraspinalnoj razini. Premda se radi o posrednom i za bol nespecifičnom markeru, c-Fos je znanstveno prihvaćen pokazatelj aktivacije neurona u bolnim stanjima. Tvar koja pokazuje analgetski učinak u bihevioralnim testovima nakon supraspinalne primjene, trebala bi smanjiti i aktivaciju c-Fos proteina.

Rezultati kvantitativne analize c-Fos ekspresije u PAG-u očekivano pokazuju aktivaciju ove regije nakon uzrokovanja upalne boli perifernom injekcijom formalina. Međutim, učinak BT-A, čak i nakon izravne primjene u moždane komore je izostao, što se očituje podjednakim brojem aktiviranih neurona kod BT-A tretiranih i kontrolnih uzoraka tkiva (Tablica 1, Slika 7). Ovi se rezultati podudaraju s prethodno napravljenim bihevioralnim pokusima u kojima BT-A nije utjecao na bolne odgovore ako je primijenjen u moždane komore, dok je značajno smanjio bol ako je primijenjen u spinalni kanal (neobjavljeni rezultati). Time je još jednom potvrđeno da se djelovanje BT-A na bol odvija prije svega na razini kralježnične moždine te da ne uključuje više supraspinalne centre.

5 ZAKLJUČAK

Sve veći broj pretkliničkih dokaza ukazuje da je mjesto djelovanja BT-A na bol središnji živčani sustav, premda nije do kraja jasno na kojim sve razinama i dijelovima nociceptivnog puta BT-A interferira s prijenosom bolne informacije.

Pretpostavlja se da BT-A na periferiji smanjuje perifernu senzitizaciju, ali da je glavno mjesto djelovanja na razini prve sinapse u nociceptivnom putu, odnosno u kralježničnoj moždini.

Ovim smo diplomskim radom, promatranjem imunoreaktivnosti c-Fos proteina kao markera aktivacije neurona i posrednog markera boli ispitali moguće djelovanje BT-A u periakveduktalnoj sivoj tvari moždanog debla, jednoj od regija mozga koja ima važnu ulogu u modulaciji nocicepcije na razini mozga.

Rezultati kvantifikacije imunoreaktivnosti u PAG-u su pokazali da periferno injiciranje formalina dovodi do aktivacije neurona u toj regiji mozga, sukladno očekivanjima i rezultatima ranijih ispitivanja. Međutim, BT-A nakon primjene u moždane komore nije djelovao, odnosno broj c-Fos pozitivnih neurona bio je isti kao i kod kontrolnih uzoraka. Ovi rezultati još su jedan od dokaza koji potvrđuju hipotezu o segmentalnom djelovanju BT-A na bol perifernog porijekla te isključuju više centre kao mjesto djelovanja BT-A.

6 LITERATURA

Antonucci F, Rossi C, Gianfrancesci L, Rossetto O, Caleo M. Long-Distance Retrograde Effects of Botulinum Neurotoxin A. *J Neurosci*, 2008, 28(14), 3689 –3696.

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

Arnon, S M, Schechter R, Inglesby TV, Henderson DA., Bartlet JG, Ascher MS, Eitzen E, Fine AD, Hauer J, Layton M, Lillibridge S, Osterholm MT, O'Toole T, Parker G, Perl TM, Philip K, Russell FK, Swerdlow DL, Tonat K, Working Group on Civilian Biodefense. Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA*, 2001, 285, 1059-1070.

Bach-Rojecky L. Antinociceptivno djelovanje botulinum toksina tipa A. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, 2006, str. 1-27, 32.

Bach-Rojecky L, Dominis, M., Lacković, Z. Lack of anti inflammatory effects of botulinum toxin A in experimental models of inflammation. *Fund Clin Pharmacol*, 2008, 22, 503–509.

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

Bach-Rojecky L, Šalković-Petrišić M, Lacković Z. Botulinum toxin type A reduces pain supersensitivity in experimental diabetic neuropathy: Bilateral 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, 183–91.

Botox; Sažetak opisa svojstava lijeka, 2017., http://www.almp.hr, pristupljeno 11.6.2017.

Botulism Fact sheet N°270. World Health Organization, 2016., http://www.who.int, pristupljeno 24.5.2017.

Brian EC. Peripheral Receptor Targets for Analgesia: Novel Approaches to Pain Management. New Jersey, John, Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2009, str. 302-304.

Burgen AS, Dickens F, Zatman LJ. The action of botulinum toxin on the neuro-muscular junction. *J Physiol*. 1949, 109(1-2), 10-24.

Carlton SM. Peripheral excitatory amino acids. *Curr Opin Pharmacol*, 2001; 1:52-6.

Cui M, Khanijou S, Rubino J, Aoki KR. Subcutaneous administration of botulinum toxin type A reduces formalin-induced pain. *Pain*, 2004, 107(1-2), 125-33.

Dickerson TJ, Smith GR, Pelletier JC, Reitz AB. 8-Hydroxyquinoline and hydroxamic acid inhibitors of botulinum neurotoxin BT-A. *Curr Top Med Chem*. 2014;14(18):2094-102.

Dressler D, Adib SF. Botulinum Toxin: Mechanisms of Action. *Eur Neurol* 2005;53:3–9.

Drinovac V, Bach-Rojecky L, Babić A, Lacković Z. Antinociceptive effect of botulinum toxin type A on experimental abdominal pain. *Eur J Pharmacol*, 2014; 745:190-5.

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

Drinovac V, Bach-Rojecky L, Lacković Z. Association of antinociceptive action of botulinum toxin type A with GABA-A receptor. *J Neural Transm*, 2013b, 665-669.

Drinovac V, Bach-Rojecky L, Matak I, Lacković Z. Involvement of m-opioid receptors in antinociceptive action of botulinum toxin type A. Neuropharmacology, 2013a, 2-6.

Ellenhorn MJ, Barceloux DG, urednici. Diagnosis and Treatment of Human Poisoning. New York, Elsevier, 1988, 1185–7.

Graven-Nielsen T, Arendt-Nielsen L. Peripheral and central sensitization in musculoskeletal pain disorders: an experimental approach. *Curr Rheumat Reports*, 2002, 4, 313-21.

Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology. Saunders Elsevier, 2011, str. 551-588.

Hamalainen MM, Ailila A, Johansson G, Pertovaara, A. Cocaineinduced effects on pain behavior and c-fos expression in the spinal dorsal horn of the rat. *Neurosci Res Commun*, 1996, 19, 67–74.

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

Harris JA, Westbrook RF, Duffield TQ, Bentivoglio M. Fos expression in the spinal cord is suppressed in rats displaying conditioned hypoalgesia. *Behav Neurosci*, 1995, 109, 320 –328.

Hoffman RO, Helveston EM. Botulinum in the treatment of adult motility disorders. Int *Ophthalmol Clin*, 1986, 26(4), 241-50.

International Association for the Study of Pain; IASP taxonomy, 2012, dostupno na: http://www.iasp-pain.org, pristupljeno 12.6.2017.

Jankovic J. Botulinum toxin in clinical pratice. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2004, 75, 951–957.

Jankovic J, Schwartz K. Botulinum toxin injections for cervical dystonia. *Neurology*, 1990, 40(2), 277-80.

Jasmin L, Wang H, Tarcy–Hornoch K, Levine JD, Basbaum AI. Differential effects of morphine on noxious stimulus-evoked Fos-like immunoreactivity in subpopulations of spinoparabrachial neurons. *J Neurosci*, 1994, 14, 7252–7260.

Ji RR, Woolf CJ. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiol Dis*, 2001, 8, 1-10.

Jones TL, Sorkin LS. Basic neurochemistry of central sensitization. *Semin Pain Med*, 2003, 1(3), 184-92.

Koltzenburg M, Wall PD, McMahon SB. Does the right side know what the left is doing? *Trends Neurosci*, 1999, 22, 122-7.

Luvisetto S, Marinelli S, Lucchetti F, Marchi F, Cobianchi S, Rossetto O et al. Botulinum neurotoxins and formalin-induced pain: central vs. peripheral effects in mice. *Brain Res*, 2006, 1082, 124-31.

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

Münchau A, Bhatia KP. Uses of botulinum toxin injection in medicine today. *BMJ*, 2000, 320, 161–5.

Naranjo JR, Mellstrom B, Achaval M, et al. Co-induction of jun B and c-fos in a subset of neurons in the spinal cord. *Oncogene*, 1991, 6, 223–227.

Nigam PK, Nigam A. Botulinum toxin. *Indian J Dermatol*, 2010, 55, 8-14.

Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates 5th edition. London, Elsevier Academic, 2004, str. 89.

Pinto M, Lima D, Tavares I. Neuronal activation at the spinal cord and medullary pain control centers after joint stimulation: A c-fos study in acute and chronic articular inflammation. *Neuroscience*, 2007, 147, 1076–1089.

Presley RW, Mene´trey D, Levine JD, Basbaum AI. Systemic morphine suppresses noxious stimulus-evoked Fos protein-like immunoreactivity in the rat spinal cord. *J Neurosci*, 1990, 10, 323–335.

Rauscher FJ 3rd, Sambucetti LC, Curran T, Distel RJ, Spiegelman BM. Common DNA binding site for Fos protein complexes and transcription factor AP-1. *Cell*, 1988, 52, 471–480.

Scott AB. Botulinum toxin injection of eye muscles to correct strabismus. *Trans Trans Am Ophthalmol Soc*, 1981, 79, 734–70.

WHO analgesic ladder, 2015., http://www.paineurope.com, pristupljeno 12.6.2017.

Yong-Jing G, Ru-Rong J. 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.

7 SAŽETAK/SUMMARY

Antinociceptivno djelovanje BT-A predmet je pretkliničkih i kliničkih istraživanja već više od 10 godina. Do sada je pokazano na različitim eksperimentalnim modelima upalne i neuropatske boli dugotrajno antinociceptivno djelovanje BT-A nakon njegove jednokratne lokalne primjene, što ga razlikuje od svih do sada poznatih analgetika.

Prethodno je pokazano da BT-A, ako se primijeni periferno (u šapu), ali i intratekalno (u spinalni kanal), smanjuje formalinom induciranu bol, kao i ekspresiju c-Fos u dorzalnom rogu kralježnične moždine (prva sinapsa u prijenosu bolne informacije). Nedostaje podataka o mogućem djelovanju BT-A na periferno uzrokovanu bol u višim područjima nociceptivnog puta. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati utjecaj botulinum toksina tipa A (BT-A) na ekspresiju c-Fos proteina u periakveduktalnoj sivoj tvari moždanog debla (PAG-u), jedne od regija mozga koja ima važnu ulogu u modulaciji nocicepcije.

Imunohistokemijskom metodom je promatrana imunoreaktivnost c-Fos pozitivnih neurona u uzorcima tkiva mozga životinja kojima je uzrokovana upalna bol perifernim injiciranjem 5%-tne otopine formalina u šapu. Jedna je skupina životinja prethodno predtretirana s BT-A koji je injiciran u lateralne moždane komore (i.c.v.) u dozi 1 i.j./kg dok je kontrolnoj skupini umjesto BT-A i.c.v. injicirana fiziološka otopina.

Rezultati pokazuju da periferno injiciranje formalina dovodi do aktivacije neurona u PAG-u, sukladno očekivanjima i rezultatima ranijih ispitivanja. Međutim, BT-A nakon primjene u moždane komore ne smanjuje aktivaciju neurona u toj regiji mozga. Ovi rezultati još su jedan od dokaza koji potvrđuju hipotezu o segmentalnom djelovanju BT-A na bol perifernog porijekla.

SUMMARY

The antinociceptive action of botulinum toxin type A (BT-A) has been the subject of preclinical and clinical research for more than 10 years. Until now, various experimental models of inflammatory and neuropathic pain have shown long-term antinociceptive activity of BT-A after its single local administration, which differentiates it from all known analgesics.

It has been shown that BT-A reduces formalin-induced pain, as well as expression of c-Fos in the dorsal horn of the spinal cord (the first synapse in the transmission of painful information), if administered peripherally (in paw pad), but also intrathecally (in the spinal canal). However, there is no data on the possible effect of BT-A on peripherally caused pain in higher areas of the nociceptive pathway. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of BT-A on the expression of c-Fos protein in the periaqueductal gray matter (PAG), one of the regions of the brain that plays an important role in the modulation of nociception.

Immunohistochemistry was used to investigate the immunoreactivity of c-Fos positive neurons in animal brain tissue samples after inducing inflammatory pain by peripheral 5% formalin injection. One group of animals was pre-treated with BT-A injected into the lateral cerebral ventricles (i.c.v.) at a dose of 1 i.j./kg while in the control group i.c.v. saline was injected in the same way.

The results show that peripheral injection of formalin causes activation of neurons in PAG, as expected based on results from previous studies. However, after i.c.v. administration to BT-A does not reduce the activation of neurons in that brain region. These results support the hypothesis of segmental activity of BT-A on the pain of peripheral origin.

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 PERIAKVEDUKTALNOJ SIVOJ TVARI U AKUTNOM MODELU BOLI

Martina Drvar

SAŽETAK

Antinociceptivno djelovanje BT-A predmet je pretkliničkih i kliničkih istraživanja već više od 10 godina. Do sada je pokazano na različitim eksperimentalnim modelima upalne i neuropatske boli dugotrajno antinociceptivno djelovanje BT-A nakon njegove jednokratne lokalne primjene, što ga razlikuje od svih do sada poznatih analgetika.
Prethodno je pokazano da BT-A, ako se primijeni periferno (u šapu), ali i intratekalno (u spinalni kanal), smanjuje formalinom induciranu bol, kao i ekspresiju c-Fos u dorzalnom rogu kralježnične moždine (prva sinapsa u prijenosu bolne informacije). Nedostaje podataka o mogućem djelovanju BT-A na periferno uzrokovanu bol u višim područjima nociceptivnog puta. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati utjecaj botulinum toksina tipa A (BT-A) na ekspresiju c-Fos proteina u periakveduktalnoj sivoj tvari moždanog debla (PAG-u), jedne od regija mozga koja ima važnu ulogu u modulaciji nocicepcije.
Imunohistokemijskom metodom je promatrana imunoreaktivnost c-Fos pozitivnih neurona u uzorcima tkiva mozga životinja kojima je uzrokovana upalna bol perifernim injiciranjem 5%-tne otopine formalina u šapu. Jedna je skupina životinja prethodno predtretirana s BT-A koji je injiciran u lateralne moždane komore (i.c.v.) u dozi 1 i.j./kg dok je kontrolnoj skupini umjesto BT-A i.c.v. injicirana fiziološka otopina.
Rezultati pokazuju da periferno injiciranje formalina dovodi do aktivacije neurona u PAG-u, sukladno očekivanjima i rezultatima ranijih ispitivanja. Međutim, BT-A nakon primjene u moždane komore ne smanjuje aktivaciju neurona u toj regiji mozga. Ovi rezultati još su jedan od dokaza koji potvrđuju hipotezu o segmentalnom djelovanju BT-A na bol perifernog porijekla.

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

Rad sadrži: 32 stranice, 7 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 46 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: botulinum toksin tipa A, PAG, c-Fos, formalinski test, supraspinalni centri, imunohistokemija

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

Rad prihvaćen: srpanj 2017.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

THE EFFECT OF BOTULINUM TOXIN TYPE A ON C-FOS ACTIVATION IN PERIAQUEDUCTAL GREY IN ACUTE PAIN MODE

Martina Drvar

SUMMARY

The antinociceptive action of botulinum toxin type A (BT-A) has been the subject of preclinical and clinical research for more than 10 years. Until now, various experimental models of inflammatory and neuropathic pain have shown long-term antinociceptive activity of BT-A after its single local administration, which differentiates it from all known analgesics.
It has been shown that BT-A reduces formalin-induced pain, as well as expression of c-Fos in the dorsal horn of the spinal cord (the first synapse in the transmission of painful information), if administered peripherally (in paw pad), but also intrathecally (in the spinal canal). However, there is no data on the possible effect of BT-A on peripherally caused pain in higher areas of the nociceptive pathway. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of BT-A on the expression of c-Fos protein in the periaqueductal gray matter (PAG), one of the regions of the brain that plays an important role in the modulation of nociception.
Immunohistochemistry was used to investigate the immunoreactivity of c-Fos positive neurons in animal brain tissue samples after inducing inflammatory pain by peripheral 5% formalin injection. One group of animals was pre-treated with BT-A injected into the lateral cerebral ventricles (i.c.v.) at a dose of 1 i.j./kg while in the control group i.c.v. saline was injected in the same way.
The results show that peripheral injection of formalin causes activation of neurons in PAG, as expected based on results from previous studies. However, after i.c.v. administration to BT-A does not reduce the activation of neurons in that brain region. These results support the hypothesis of segmental activity of BT-A on the pain of peripheral origin.

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

Thesis includes: 32 pages, 7 figures, 1 table and 46 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Botulinum toxin type A, PAG, c-Fos, formalin test, supraspinal regions, immunohistochemistry

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
Sandra Šupraha Goreta, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Jasna Jablan, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2017.