



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Višnja Drinovac Vlah

**SREDIŠNJI NEUROTRANSMITORI I  
MEHANIZAM ANTINOCICEPTIVNOG  
DJELOVANJA BOTULINUM TOKSINA  
TIPA A**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2017.



University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Višnja Drinovac Vlah

**CENTRAL NEUROTRANSMITTERS AND  
MECHANISM OF ANTINOCICEPTIVE  
EFFECT OF BOTULINUM TOXIN TYPE A**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2017.



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

VIŠNJA DRINOVAC VLAH

**SREDIŠNJI NEUROTRANSMITORI I  
MEHANIZAM ANTINOCICEPTIVNOG  
DJELOVANJA BOTULINUM TOKSINA  
TIPA A**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Izv. prof. dr. sc. Lidija Bach-Rojecky

Prof. dr. sc. Zdravko Lacković

Zagreb, 2017.



University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

VIŠNJA DRINOVAC VLAH

**CENTRAL NEUROTRANSMITTERS AND  
MECHANISM OF ANTINOCICEPTIVE  
EFFECT OF BOTULINUM TOXIN TYPE A**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Assoc. Prof. Lidija Bach-Rojecky, PhD

Prof. Zdravko Lacković, PhD

Zagreb, 2017.



Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana farmaceutske znanosti.

Rad je izrađen na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zavodu za farmakologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i manjim dijelom na Klinici za neurologiju Sveučilišne bolnice u Würzburgu (Njemačka), u sklopu doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te u sklopu projekata: “ Neurotransmitori i novi mehanizmi djelovanja lijekova i otrova” Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa (006-0982913-1219), „Antinociceptive activity of botulinum toxin type A: new mechanism of action, new indications“ DAAD suradnog projekta Würzburg - Zagreb - Rijeka - Tuzla - Sarajevo - Mostar i „Klostridijski neurotoksini i mozak“ Hrvatske zaklade za znanost (IP-2014-09-4503).

*Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Lidiji Bach-Rojecky i ko-mentoruu prof. dr. sc. Zdravku Lackovićuu na savjetovanju, vođenju i strpljenju tijekom mog znanstvenog odrastanja, a posebno na nesebičnoj i prijateljskoj pomoći i razumijevanju u određenim trenucima. Hvala na prenesenom znanju.*

*Hvala mojim „Botox-kolegama“, dr.sc. Ivici Matakui i dr.sc. Borisu Filipovićuu, na korisnim savjetima pri izvođenju i planiranju pokusa te pisanju znanstvenih radova, a posebno na zabavnim boravcima u labosu.*

*Posebno hvala tehničkoj suradnici, gđi. Božici Hržan, na pomoći pri izvođenju pokusa, te svim djelatnicima Zavoda za farmakologiju Medicinskog fakulteta i Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na podršci. Hvala prof. dr. sc. Claudii Sommer i dr.sc. Nurcan Üçeyler na suradnji i pomoći tijekom boravka u Njemačkoj.*

*Mojoj dragoj obitelji i prijateljima zahvaljujem na razumijevanju, ljubavi, podršci i vjeri u moj uspjeh.*

*I za kraj, hvala mom suprugu koji me usmjerio na ovaj put i koji mi je najveća sreća i podrška u životu*

# SAŽETAK

**Uvod:** Novi dokazi ukazuju da je antinociceptivno djelovanje botulinum toksina tipa A (BT-A) središnjeg porijekla. U ovom doktorskom radu smo provjerili ovu pretpostavku u ranije nedovoljno istraženim oblicima boli, istraživali interakciju sa središnjim neurotransmitorima kao mogući mehanizam djelovanja te pokušali pobliže utvrditi mjesto djelovanja toksina u središnjem živčanom sustavu (SŽS).

**Materijali i metode:** Ispitivanja su izvedena na mužjacima Wistar štakora. U upalnoj, neuropatskoj i bilateralnoj mišićnoj boli ispitan je učinak selektivnih i neselektivnih antagonista opioidnih i GABA<sub>A</sub> receptora, primijenjenih sistemski, spinalno ili supraspinalno, na antinociceptivno djelovanje periferno (supkutano u šapu) primijenjenog BT-A. U tkivu kralješnične moždine ispitan je aktivacija neuronalnih i glija stanica, ekspresija mRNA proupalnih citokina i  $\mu$ -opioidnih receptora te ekspresija Leu/Met-enkefalina metodama imunofluorescencije i lančane reakcije polimerazom s reverznom transkripcijom. Istraživano je antinociceptivno djelovanje BT-A nakon periferne, spinalne i supraspinalne primjene te je imunofluorescencijom ispitan enzimski aktivnost BT-A u tkivu SŽS-a.

**Rezultati:** Opioidni i GABA<sub>A</sub> antagonisti su ovisno o dozi, sistemski i intratekalno, ali ne i supraspinalno, poništili antinociceptivno djelovanje BT-A u svim ispitanim modelima. Učinak antagonista bio je kratkotrajan. BT-A je smanjio neuronalnu aktivaciju u dorzalnom rogu kralješnične moždine, što su antagonisti blokirali. BT-A je smanjio bol u dosad neistraženim modelima visceralne boli (peritonitis, kolitis). Bilateralno antinociceptivno djelovanje BT-A posljedica je prisutnosti toksina samo na ipsilateralnoj strani. BT-A je smanjio bol nakon periferne i intratekalne primjene, dok primijenjen supraspinalno (*cisterna magna*, moždane komore) nije djelovao, unatoč nalazu njegove enzimski aktivnosti u pojedinim regijama mozga uključenima u nocicepciju.

**Zaključak:** BT-A ima segmentalno antinociceptivno djelovanje spinalnoj razini, uz neizravnu aktivaciju endogenog opioidnog i GABA-ergičkog sustava. Ovi bi nalazi mogli biti važni za klinička ispitivanja potencijalno korisnih sinergističkih interakcija s konvencionalnim analgeticima i drugim lijekovima te usmjeriti klinička ispitivanja na nove indikacije i nove načine primjene, poput intratekalne.

*Ključne riječi: botulinum toksin tipa A, središnje antinociceptivno djelovanje, segmentalno djelovanje na spinalnoj razini, opioidni sustav, GABA-ergički sustav*

# SUMMARY

**Background:** Botulinum toxin type A (BT-A), a neurotoxin produced by anaerobic bacteria *Clostridium botulinum*, is one of the most potent biological toxins, causing botulism with muscular paralysis as the most prominent symptom. On the other hand, its clinical value is continuously growing for several decades. Therapeutic utility was enabled with the discovery of BT-A's mechanism of action and the possibility to safely apply low (picomolar) doses of purified toxin locally into muscle or under skin, where it selectively enters the nerve endings and enzymatically cleaves synaptosomal-associated protein of 25 kDa (SNAP-25), thereby causing inhibition of neurotransmitters' exocytosis. Nowadays, it is widely used in various hypercontractile neuromuscular disorders, hypersecretory autonomic disorders, and hypersensitive painful disorders, while its application in cosmetic purposes for reduction of wrinkles is the most popular.

Novel preclinical evidence over the last 15 years has demonstrated that microtubule-dependent retrograde axonal transport from periphery through sensory neurons to the central nervous system (CNS) is a prerequisite for BT-A's beneficial effect in painful disorders, although the mechanism of action in central synapses remains unclear. In addition to long-lasting antinociceptive effect after single application (up to 6 months in humans), which makes BT-A an emerging drug in chronic pain treatment, antinociceptive activity of BT-A differs from conventional analgesics in that it has no effect on acute nociceptive pain and normal pain thresholds but it selectively reduces pain hypersensitivity which develops during pathological processes and subsequent sensitization of spinal and supraspinal pain-related structures. These unique properties raised new questions and opened new possibilities, such as BT-A's selectivity for certain types of cells in the CNS and/or involvement of certain central neurotransmitter systems involved in pain modulation. Since central sensitization involves different processes, including those causing attenuations of inhibitory influences in dorsal horn of the spinal cord, the aim of this doctoral thesis was to examine the hypothesis that BT-A's antinociceptive effect involves potential interaction with endogenous inhibitory neurotransmitter systems, opioid and GABA-ergic, as well as to characterize the site of BT-A's action on central nociceptive transmission.

**Methods:** Experiments were performed on 3- to 4-month-old male Wistar rats. Involvement of endogenous opioid and GABA-ergic systems in the antinociceptive effect of peripherally applied BT-A (intraplantar; subcutaneously into the plantar surface of the rat's hind paw pad) was investigated in three pathophysiologically different models: formalin-induced

inflammatory pain, neuropathic pain induced by partial sciatic nerve transection and bilateral pain induced by intramuscular carrageenan injection. We tested the effects of nonselective opioid antagonist naltrexone, selective  $\mu$ -opioid antagonist naloxonazine, and selective GABA<sub>A</sub> antagonist bicuculline. Possible central site of interaction was examined after different routes of antagonists' application: systemic, spinal (intrathecal) and supraspinal (into *cisterna magna* or cerebral ventricles). Additionally, dose-response experiment (the dependence of blockade of BT-A's antinociceptive action on the applied doses of opioid antagonist naltrexone) was performed to exclude the possibility that antagonists change the nociceptive response independently from BT-A's action. After behavioral tests, spinal cord tissue was examined to determine which CNS cells (neuronal and/or glial) mediate BT-A's interaction with an endogenous opioid system. Neuronal (c-Fos expression) and glial (expression of GFAP for astrocytes and CD11b for microglia) activation were examined using immunofluorescence. Additionally, functional consequences of glial activation were investigated, e.g. expression of proinflammatory cytokines TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , using quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR). Furthermore, we investigated possible changes in spinal  $\mu$ -opioid receptor mRNA and Leu/Met-enkephalin protein expression using qRT-PCR and immunofluorescence.

Since the site of central antinociceptive effect of BT-A is not clear, we also tested BT-A' effects after its peripheral and intrathecal, versus intracisternal and intracerebroventricular application in: bilateral pain induced by intramuscular carrageenan, visceral pain (colitis induced by intracolonic instillation of capsaicin and peritonitis induced by intraperitoneal injection of acetic acid), and inflammatory pain induced by intraplantar and orofacial formalin injection. Enzymatic activity of BT-A within the brain and medulla after application of BT-A into *cisterna magna* and cerebral ventricles was examined by immunodetection of cleaved SNAP-25 (cl-SNAP25).

**Results:** Opioid and GABA<sub>A</sub> antagonists, applied systemically and intrathecally, but not in *cisterna magna* or cerebral ventricles, dose-dependently abolished the antinociceptive effect of peripherally applied BT-A in all tested experimental models. The effect of antagonists was short-lasting (dependent on pharmacokinetic properties of an applied antagonist). BT-A reduced neuronal activation in the dorsal horn, which was abolished by both, naltrexone and bicuculline. BT-A's effects on pain-induced glial activation were ambiguous: it reduced microglial activation but increased the activation of astroglial cells. Using the measure of immunofluorescence intensity was not possible to determine the potential effect of BT-A on Leu/Met-enkephalin expression in the dorsal horn. We found no changes during pain in  $\mu$ -

opioid receptors' mRNA expression in lumbar spinal cord after peripheral pretreatment with BT-A.

Additionally, BT-A reduced pain and neuronal activation in two models of visceral pain (colitis and peritonitis). Interestingly, after unilateral local application, BT-A exerted bilateral antinociceptive effect which is a consequence of ipsilateral enzymatic activity only. BT-A reduced visceral and bilateral pain only after peripheral and intrathecal application, while it had no effect after intracisternal injection. Additionally, it had no effect on formalin-induced inflammatory pain either applied in *cisterna magna* or in lateral cerebral ventricles, although clSNAP-25 was present in deep supraspinal nociceptive regions.

**Conclusions:** Central antinociceptive effect of BT-A involves an interaction with inhibitory endogenous opioid and GABA-ergic systems at the spinal level in pathophysiologically different types of pain: inflammatory, neuropathic, and bilateral. According to the results presented in this doctoral thesis, BT-A activates spinal inhibitory neurotransmitter systems. This might be the reason for BT-A's selective antinociceptive effect on pathological pain hypersensitivity. Since the only known mechanism of BT-A's action is inhibition of neurotransmitters' exocytosis mediated by SNAP-25 cleavage, the observed activation of endogenous opioid and GABA-ergic systems probably occurs indirectly and by a yet unknown mechanism which might be the consequence of other SNAP-25 physiological functions (except mediation of neuroexocytosis). However, the net effect of BT-A's interaction with spinal inhibitory neurotransmitters is the reduction of dorsal horn neurons' activation. BT-A has no effect on pain after supraspinal application although the product of its enzymatic activity is detected in deep supraspinal regions involved in nociception. Overall, the scientific contribution of this doctoral thesis are insights into segmental antinociceptive effects of BT-A involving central inhibitory neurotransmitter systems. These findings might contribute to the understanding of BT-A's action on pain hypersensitivity and possible improvement of its clinical application.

*Keywords: botulinum toxin type A; central antinociceptive effect, segmental effect at the spinal level, opioid system, GABA-ergic system*

# Sadržaj

1	UVOD.....	1
1.1	BOL.....	2
1.1.1	Posebnosti nocicepcijskog sustava .....	3
1.1.2	Prijenos bolnog podražaja.....	3
1.1.3	Podjela boli .....	10
1.1.4	Senzitizacija kao uzrok bolne preosjetljivosti.....	11
1.1.5	Kako i kada nastaje patološka bol? .....	16
1.1.6	Liječenje boli .....	20
1.2	BOTULINUM TOKSIN TIPA A: OD BOTULIZMA DO LIJEČENJA BOLI.....	22
1.2.1	Struktura BT-A i mehanizam djelovanja .....	22
1.2.2	Klinička primjena BT-A .....	25
1.2.3	Antinociceptivno djelovanje BT-A.....	27
1.3	ISTRAŽIVANJA MEHANIZMA ANTINOCICEPTIVNOG UČINKA BT-A.....	32
1.3.1	Retrogradni aksonalni transport BT-A u SŽS nakon periferne primjene .....	34
1.3.2	Selektivnost djelovanja BT-A na bolnu preosjetljivost .....	36
2	CILJ I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA.....	39
3	MATERIJALI I METODE .....	41
3.1	Životinje .....	42
3.2	Ispitivane tvari.....	42
3.2.1	Primjena ispitivanih tvari i korištene doze.....	42
3.2.2	Opisi načina primjene tvari .....	43
3.3	Kemikalije i reagensi.....	44
3.4	Eksperimentalni modeli boli .....	45
3.4.1	Mjerenje mehaničke hiperalgezije metodom pritiska šape .....	46
3.4.2	Mjerenje mehaničke alodinije primjenom von Freyjevih filamenata (vFF).....	46

3.4.3	Mjerenje hladne alodinije primjenom acetona.....	46
3.5	Eksperimentalni protokoli.....	47
3.5.1	Formalinski test.....	47
3.5.2	Orofacijalni formalinski test.....	47
3.5.3	Parcijalno presijecanje n. ischiadicusa (PPNI).....	47
3.5.4	Karagenanom uzrokovana sekundarna alodinija i bilateralna bol.....	48
3.5.5	Peritonitis uzrokovan octenom kiselinom.....	49
3.5.6	Kolitis i prenesena bol uzrokovana kapsaicinom.....	49
3.6	Analiza tkiva.....	50
3.6.1	Imunofluorescencija.....	50
3.6.2	Lančana reakcija polimerazom s reverznom transkripcijom (qRT-PCR).....	51
3.7	Statistička obrada podataka.....	52
4	REZULTATI.....	53
4.1	Periferno primijenjeni BT-A aktivira inhibicijske neurotransitorske sustave na spinalnoj razini.....	54
4.1.1	Uključenost endogenog opioidnog sustava u antinociceptivni učinak BT-A....	54
4.1.2	Uključenost GABA-ergičkog sustava u antinociceptivno djelovanje BT-A.....	58
4.1.3	Bilateralni antinociceptivni učinak BT-A nakon unilateralne primjene: interakcija s opioidnim i GABA-ergičkim sustavom na spinalnoj razini.....	60
4.2	Interakcija BT-A s endogenim opioidnim sustavom smanjuje neuronalnu aktivaciju u dorzalnom rogu.....	62
4.2.1	Aktivacija neuronalnih stanica u dorzalnom rogu kralješnične moždine.....	62
4.2.2	Aktivacija glija stanica u dorzalnom rogu kralješnične moždine.....	64
4.2.3	Učinak BT-A na ekspresiju Leu/Met-enkefalina i mRNA $\mu$ -opioidnih receptora	
	68	
4.3	Mjesto središnjeg antinociceptivnog djelovanja BT-A: segmentalni učinak na spinalnoj razini.....	71
4.3.1	Visceralna bol.....	71



4.3.2	Bilateralna bol uzrokovana unilateralnom ozljedom .....	74
4.3.3	Supraspinalno primijenjen BT-A ne smanjuje bol nakon injiciranja formalina u šapu, ali smanjuje bol nakon injiciranja formalina u orofacijalno područje.....	75
4.3.4	Enzimska aktivnost BT-A u SŽS-u nakon i.pl., i.c. i i.c.v. primjene BT-A .....	76
5	RASPRAVA .....	79
5.1	Periferno primijenjen BT-A aktivira inhibicijske neurotransmitske sustave na spinalnoj razini.....	80
5.1.1	Opioidni sustav .....	81
5.1.2	GABA-ergički sustav.....	84
5.2	Interakcija BT-A s endogenim inhibicijskim sustavima smanjuje neuronalnu aktivaciju u dorzalnog rogu .....	85
5.3	Mjesto središnjeg antinociceptivnog djelovanja BT-A: segmentalni učinak na spinalnoj razini.....	87
5.3.1	BT-A smanjuje visceralnu bol različitog uzroka nakon spinalne primjene .....	88
5.3.2	BT-A smanjuje bilateralnu bol uzrokovanu unilateralom ozljedom.....	90
6	ZAKLJUČCI.....	94
7	LITERATURA .....	96
8	PRILOZI .....	117
9	ŽIVOTOPIS.....	152

## Kratice

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

**ATP** – adenzin trifosfat

**B** – bikukulin

**BDNF** – neurotrofni čimbenik porijeklom iz mozga (*engl. Brain-Derived Neurotrophic Factor*)

**BT-A** – botulinum toksin tipa A

**CaMK-II** – o kalciju i kalmodulinu ovisna protein kinaza 2

**CCI** – kronična konstriksijska ozljeda (*engl. Chronic Constriction Injury*)

**CD11b** – integrin  $\alpha$ M (*engl. Cluster of Differentiation molecule 11b*)

**CFA** – kompletni Freundov adjuvans (*engl. Complete Freund's Adjuvant*)

**CGRP** – polipeptid kalcitoninskog gena (*engl. Calcitonin Gene-Related Peptide*)

**COX-2** – ciklooksigenaza 2 (*engl. CycloOxygenase 2*)

**CSF** – cerebrospinalna tekućina (*engl. CerebroSpinal Fluid*)

**DRG** – gangliji dorzalnih korjenova (*engl. Dorsal Root Ganglion*)

**ERK** – kinaza regulirana izvanstaničnim signalom (*engl. Extracellular signal-Regulated Kinase*)

**f.o.** – fiziološka otopina

**GABA** –  $\gamma$ -amino-maslačna kiselina (*engl.  $\gamma$ -AminoButyric Acid*)

**GFAP** – kiseli vlaknasti protein glije (*engl. Glial Fibrillary Acidic Protein*)

**Gly** – glicin

**i.c.** – intracisternalno

**i.c.v.** – intracerebroventrikularno

**i.col.** – intrakolonarno

**i.j.** – internacionalna jedinica

**i.p.** – intraperitonealno

**i.pl.** – intraplantarno

**i.t.** - intratekalno

**IBA1** – adaptorska molekula koja veže ionizirani kalcij 1 (*engl. Ionized calcium-Binding Adaptor molecule 1*)

**IL** – interleukin; **IL-1 $\beta$**  – interleukin 1 $\beta$ ; **IL-6** – interleukin 6

**LC** – locus coeruleus

**Leu/MetENK** – Leu/Met-enkefalin

**MAPK** – kinaza aktivirana mitogenom (*engl. Mitogen-Activated Protein Kinase*)

**MOR** –  $\mu$ -opioidni receptor

**N** – naltrekson

**NA** – noradrenalin

**NGF** – čimbenik rasta neurona (*engl. Nerve Growth Factor*)

**NMDA** - N-metil-D-aspartat

**NN** – naloksonazin

**NO** – dušikov oksid (*engl. Nitric Oxide*)

**PAG** – siva tvar oko akvedukta u mezencefalonu (*engl. Periaqueductal Gray matter*)

**PBS** – fosfatima puferirana fiziološka otopina

**PBS-T** – fosfatima puferirana fiziološka otopina s dodatkom 0.25% Tritona X-100

**PKA** – protein kinaza A; **PKC** – protein kinaza C; **PKC $\gamma$ +** - izoforma  $\gamma$  protein kinaze C

**PPNI** – parcijalno presijecanje *n. ischiadicusa*

**qRT-PCR** – kvantitativna lančana reakcija polimerazom s reverznom transkripcijom (*engl. Quantitative real time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*)

**RVM** – rostralna ventromedijalna jezgra (*engl. Rostral Ventromedial Medulla*)

**s.c.** – supkutano

**SNAP-25** – sinaptosomalni protein veličine 25 kDa (*engl. Synaptosomal Associated Protein of 25 kDa*); **clSNAP-25** – pocijepani SNAP-25 (*od engl. Cleaved SNAP-25*)

**SNARE** – receptor koji veže topljivi faktor osjetljiv na N-etilmaleamid (*engl. Soluble N-ethylmaleimide Attachment protein REceptor*)

**SP** – tvar P (*engl. Substance P*)

**SV2** – sinaptički vezikularni protein 2 (*engl. Synaptic Vesicle protein 2*)

**SŽS** – središnji živčani sustav

**TG** – trigeminalni ganglij

**TNC** – trigeminalna kaudalna jezgra (*engl. Trigeminal Nucleus Caudalis*)

**TNF $\alpha$**  – čimbenik nekroze tumora (*engl. Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* )

**TRPV1** – vaniloidni receptor 1 (*engl. Transient Receptor Potential cation channel subfamily Vaniloid, type 1*)

**VAMP** – membranski vezikularni protein (*engl. Vesicle-Associated Membrane Protein*)

**vFF** – von Freyjevi filament

# **1 UVOD**

## 1.1 BOL

Bol je neugodno osjetno i emocionalno iskustvo koje nastaje kao posljedica dvaju složenih procesa: prijenosa bolne informacije s mjesta ozljede do mozga (nocicepcije) te njene emocionalne i kognitivne obrade u višim centrima u mozgu.

Osjet boli ima važnu fiziološku ulogu u preživljavanju i zaštiti organizma u okolišu, s obzirom da omogućuje opažanje štetnog podražaja i pokretanje reakcije kako bi se štetan podražaj izbjegao te kako bi oštećeno tkivo zacijelilo. Gubitkom ove zaštitne funkcije bol postaje patološka, te i sama može oštetiti funkcioniranje organizma. Takva je bol najčešće kroničnog trajanja, a može biti posljedica patoloških upalnih procesa u somatskim strukturama i unutarnjim organima ili oštećenja živčanog sustava. Usprkos intenzivnim istraživanjima, još uvijek nije potpuno jasno kojim mehanizmima kronična patološka bol mijenja fiziološke procese, koji u normalnim uvjetima služe zaštiti od ozljede i poticanju cijeljenja.

Kronična bol definira se kao bol koja traje dulje od 3 mjeseca (Treede i sur., 2015.), što se smatra vremenskim razdobljem u kojem bi različiti uzroci boli trebali nestati, a proces cijeljenja završiti. Učestalost kronične boli u SAD-u varira između 15 i 64%, u Europi 5–33% te na globalnoj razini 2–55%, ovisno o metodama prikupljanja podataka (Ossipov i sur., 2014.). Osim što negativno utječe na kvalitetu života pacijenata i smanjuje radnu produktivnost, zdravstveni troškovi za liječenje godišnje iznose između 560 i 635 milijardi američkih dolara (Ossipov i sur., 2014.), a postojeće terapijske opcije nisu zadovoljavajuće zbog nekoliko razloga: varijabilne učinkovitosti, kratkotrajnog djelovanja te nuspojava vezanih uz dugotrajnu primjenu, poput gastrotoksičnosti nesteroidnih protuupalnih lijekova te razvoja tolerancije i ovisnosti na opioidne agoniste. Stoga se kronična bol smatra posebno važnim javnozdravstvenim problemom, te je uvrštena kao posebna bolest pod nazivom „kronični bolni sindrom“ u 10. reviziju međunarodne klasifikacije bolesti (Treede i sur., 2015.). Postoje značajne interindividualne razlike u vjerojatnosti nastanka kronične boli nakon početne ozljede, no čini se da najveći utjecaj imaju psihosocijalni čimbenici i komorbiditeti s depresijom, anksioznim i sličnim poremećajima (Ossipov i sur., 2014.).

Razumijevanje nastanka i održavanja patološke boli različitog uzroka, traganje za novim farmakološkim „metama“ i unapređenje konvencionalnih analgetika u središtu je interesa istraživanja boli.

### 1.1.1 Posebnosti nocicepcijskog sustava

Osjet boli dio je skupine somatosenzornih osjeta, uz mehanički (dodir, tlak, vibracije i treperenje), toplinski (toplo i hladno), proprioceptivni (osjet položaja i zglobnih pokreta) i osjet visceralnog istezanja (Arezzo i sur., 1982.). Navedeni se osjeti registriraju pomoću pripadajućih osjetnih receptora u površinskim (koža) i dubokim (mišić, zglob, kost) somatskim strukturama i visceralnim organima te prenose informacije u SŽS putem primarnih aferentnih neurona. Pritom se osjet boli razlikuje od ostalih osjetnih modaliteta, čija je uloga primarno informativna i ne zahtijeva reakciju organizma, odnosno organizam se prilagođava podražajima iz okoline. Receptori za bol (nociceptori), za razliku od drugih osjetnih receptora, nemaju svojstvo prilagodbe na podražaj (desenzitizacije). Štoviše, uslijed ponavljanja podražaja njihova se osjetljivost povećava, odnosno dolazi do senzitivacije. Osim toga, u fiziološkim ih uvjetima aktiviraju samo podražaji dovoljno visokog intenziteta; primjerice, aktiviraju se tek pri temperaturi koja oštećuje tkivo (~ 45 °C), za razliku od termoreceptora koji izvješćuju organizam o temperaturi kože.

Nociceptori se nalaze na perifernim završecima mijeliniziranih A $\delta$  i nemijeliniziranih C živčanih vlakana (Julius i Basbaum, 2001.). Prema tome ih dijelimo u 2 osnovne skupine:

- **A $\delta$ -nociceptore**, koje podražuje mehanička stimulacija (poput ubadanja i gnječenja), zbog čega ih nazivamo **mehanosenzitivnima**
- **C-nociceptore**, koji reagiraju na mehaničke, kemijske i termalne podražaje te ih stoga nazivamo **polimodalnima**.

Postoje i tzv. **tih** nociceptori. Oni se aktiviraju tek u stanju periferne senzitivacije prilikom ozljede tkiva (vidi: Periferna senzitivacija). Bolni impulsi mogu nastajati i spontano, na mjestu ozlijeđenog aksona, otkuda putuju prema kralješničnoj moždini (Blumberg i Jänig, 1984.).

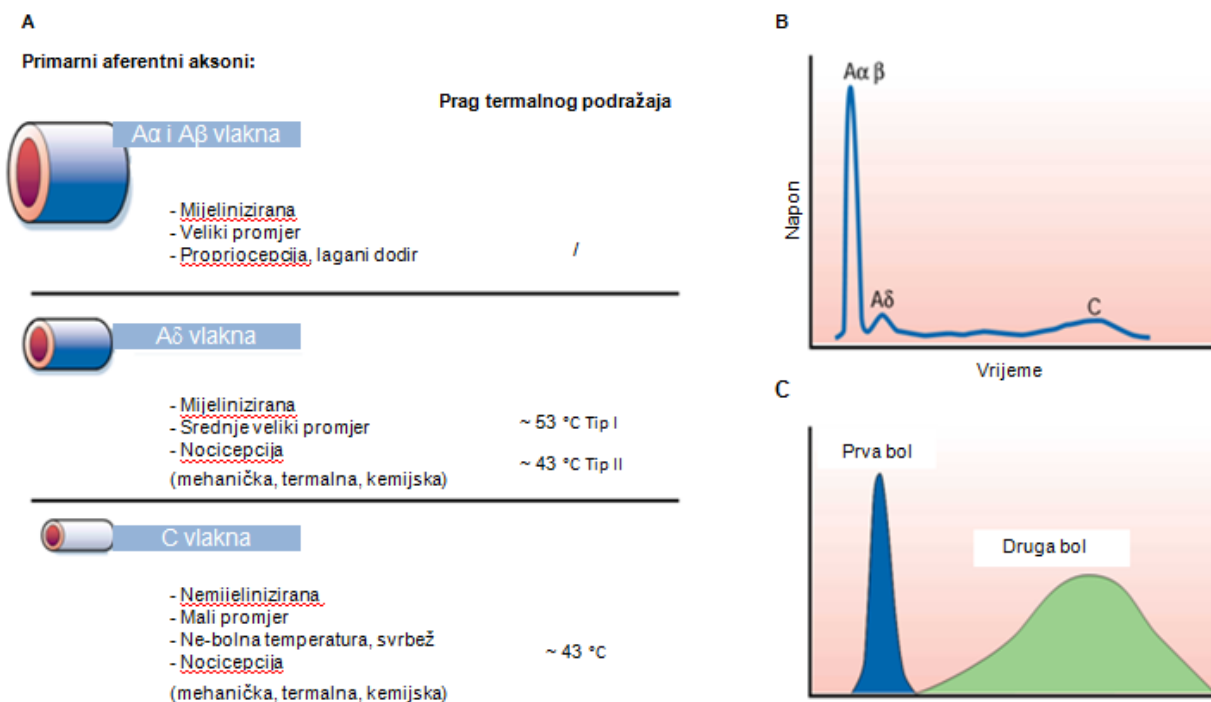
### 1.1.2 Prijenos bolnog podražaja

Nociceptori različite termalne, mehaničke ili kemijske podražaje visokog intenziteta prevode u električnu aktivnost (akcijski potencijal). Ovaj proces nazivamo **transdukcijom**, a posredovan je specifičnim ionskim kanalima smještenim na membranama nociceptora, poput porodice neselektivnih kationskih kanala TRPA (engl. *Transient Receptor Potential, subfamily A*), TRPM (engl. *Transient Receptor Potential Melastatin*) i TRPV (engl. *Transient Receptor Potential Vanilloid*), te ASIC (engl. *Acid-Sensing Ion Channels*) kanala,

koji depolariziraju periferni završetak aktivacijom natrijevih ionskih kanala ovisnih o naponu NaV1.8/1.9 (Woolf i Ma, 2007.).

Živčani impulsi nastali aktivacijom nociceptora putuju primarnim aferentnim neuronima prema dorzalnog rogu kralješnične moždine, odnosno za područje glave i vrata prema trigeminalnoj kaudalnoj jezgri (engl. *Trigeminal Nucleus Caudalis*, TNC). Tijela ovih pseudounipolarnih neurona smještena su u ganglijima dorzalnih korjenova kralješnične moždine (engl. *Dorsal Root Ganglion*, DRG), odnosno u trigeminalnom gangliju (TG).

Proces provođenja bolnog podražaja primarnim aferentnim neuronom nazivamo **kondukcijom**. Kako je prethodno navedeno, dvije su vrste vlakana kojima se provodi bolna informacija (Slika 1a): A $\delta$  i C. Kutana C vlakna su nemijelinizirana i male brzine provođenja (0,5–1,2 m/s), dok A $\delta$  mijelinizirana vlakna provode akcijske potencijale većom brzinom (12–36 m/s). Stoga je kutana bol karakterizirana s dvije faze: brзом, čiji je prijenos posredovan A $\delta$  vlaknima te sporom, čiji je prijenos posredovan C vlaknima (Julius i Basbaum, 2001.) (Slika 1b).



**Slika 1 A) Svojstva primarnih aferentnih vlakana i B) brzine provođenja u odnosu na promjer vlakna:** A $\alpha$  vlakna su mijelinizirana vlakna velike brzine provođenja impulsa. Sudjeluju u brzom prijenosu informacija između mišića i kralješnične moždine. Primarna A $\beta$  vlakna su mijelinizirana vlakna velikog promjera, a njihova stimulacija u koži, mišićima ili zglobovima ne uzrokuje bol. Dva su tipa A $\delta$  vlakana. Tip I A $\delta$ -vlakana odgovara na jaki termalni podražaj (~ 52 °C) i nije osjetljiv na kapsaicin, dok tip II A $\delta$  vlakana, kao i C vlakna, reagiraju na srednje jaki termalni podražaj (~ 45 °C) i kapsaicin. **C) Prikaz 2 faze kutane boli kao posljedice različite brzine provođenja A $\delta$  i C vlakana** (Julius i Basbaum, 2001.)

U prijenosu bolnog podražaja iz visceralnih organa sudjeluju primarno C vlakna (Robinson i Gebhart, 2008.), dok se podražaji iz mišića prenose mijeliniziranim vlaknima skupine III (po karakteristikama odgovaraju kutanim A $\delta$  vlaknima) i nemijeliniziranim vlaknima skupine IV (po karakteristikama odgovaraju kutanim C vlaknima) (Radhakrishnan i sur., 2003.). Postoje dva tipa A $\delta$  vlakana; oba odgovaraju na intenzivan mehanički podražaj, no tip I A $\delta$ -vlakana odgovara na jaki termalni podražaj ( $\sim 52$  °C), dok tip II A $\delta$  vlakana reagira na srednje jaki termalni podražaj ( $\sim 45$  °C) (Slika 1a). U nocicepciji sudjeluju i **A $\beta$ -mehanoreceptorska vlakna** koja inače prenose mehaničke podražaje niskog intenziteta (npr. dodir). Njihova je zadaća vrlo važna u „nadzoru“ boli na spinalnoj razini i nastanku bolne preosjetljivosti u fiziološkim i patološkim uvjetima, što će biti opisano kasnije u tekstu. A $\alpha$  vlakna su, slično A $\beta$  vlaknima, mijelinizirana vlakna velike brzine provođenja impulsa, no nemaju ulogu u nocicepciji. Sudjeluju u brzom prijenosu informacija između mišića i kralješnične moždine.

Dorzalni rog kralješnične moždine središnje je mjesto na kojemu se odvija prijenos (**transmisija**) bolne informacije u SŽS te je podložno razvoju različitih patoloških promjena. To je i glavno je mjesto na kojem se bolna informacija može modulirati. Proces transmisije odvija se

u sinapsama putem različitih kemijskih posrednika: neurotransmitora i neuropeptida. Ovaj prijenos može biti monosinaptički (izravan, uključuje prijenos informacije s perifernog neurona na drugi neuron u osjetnom putu), ili može biti polisinaptički (u prijenos bolne informacije uključeni su interneuroni).

U dorzalnom rogu se nalaze četiri važne neuronalne komponente koje ulaze u složene interakcije (Prescott i sur., 2014.). To su:

1. **središnji završeci primarnih aferentnih neurona**, koji ulaze u različita područja dorzalnog roga (ovisno o vrsti primarnog aferentnog vlakna);
2. **intrinzični neuroni (interneuroni)**, čiji su aksoni kratki, tj. ostaju u kralješničnoj moždini ili lokalno ili se šire u druge spinalne segmente;
3. **projekcijski neuroni (neuroni drugog reda)**, čiji aksoni prolaze rostralno u područje bijele tvari te uzlaznim putovima dolaze do različitih regija mozga;
4. **završeci aksona silaznih putova** iz nekoliko regija mozga, koji prolaze kaudalno.

Stražnji se rog kralješnične moždine može, na osnovu citoloških svojstava neurona, podijeliti u 6 slojeva (lamine I–VI). Kutana primarna aferentna nocicepcijska A $\delta$  i C vlakna završavaju na neuronima smještenima u površinskim slojevima stražnjeg roga, odnosno marginalnom sloju (lamina I) i želatinoznoj tvari (*substantia gelatinosa*, lamina II), te u dubljoj lamini V



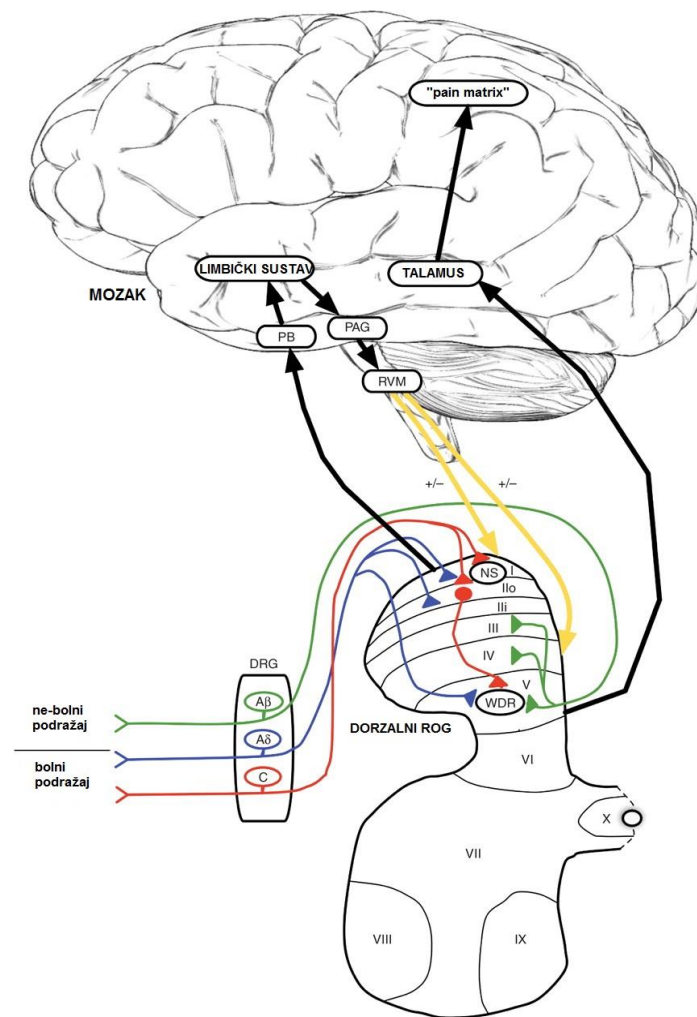
(Todd, 2002.). U laminama III i IV nalaze se neuroni koji stvaraju sinapse s nenocicepcijskim A $\beta$  vlaknima (Slika 2).

Projekcijski neuroni u dorzalnom rogu, koji stvaraju sinapse samo s nocicepcijskim A $\delta$  i C vlaknima nazivamo **nocicepcijski specifičnim neuronima** (engl. *Nociceptive Specific, NS*). Oni čine samo 5% neurona lamine I (Spike i sur., 2003). Osim NS neurona, nalazimo i manje specifične **neurone širokog raspona** (engl. *Wide Dynamic Range, WDR*). Oni su dio neurona lamina II i V te primaju i ne-bolne podražaje koje prenose A $\beta$  vlakna. Najveći dio neurona u laminama I–III su **interneuroni** koji mogu biti ekscitacijski ili inhibicijski, ovisno o neurotransmitorima koje luče. Ovi interneuroni povećavaju ili smanjuju podražljivost NS i WDR neurona, utječući tako na informaciju koja se prenosi u mozak. Nemijelinizirana vlakna iz unutarnjih organa, zglobova i mišića primarno završavaju u lamini I, te laminama V/VI. Postoji značajan stupanj konvergencije između različitih tkiva, pa prema tome pojedini neuroni dorzalnog roga mogu stvarati sinapse s primarnim aferentnim vlaknima iz različitih izvora, npr. iz mišića i kože ili unutarnjih organa i kože (Millan, 1999.). Somato-visceralna konvergencija predstavlja anatomsku osnovu za fenomen prenesene (refleksne) boli (Gebhart, 1995.).

Bolna informacija iz kralješnične moždine projekcijskim neuronima putuje u mozak koristeći nekoliko različitih uzlaznih putova, što je eksperimentalno pokazano elektrofiziološkim i anatomskim tehnikama. Primarni put prijenosa je spino-talamički put, u kojem neuroni drugog reda (iz lamine I i V) izravno stvaraju sinapse s neuronima trećeg reda u talamusu (Millan, 1999.). Talamus je jedna od struktura u mozgu u kojoj završavaju i drugi uzlazni nocicepcijski putovi te se smatra ključnom u **obradi i integraciji** senzorno-diskriminativne komponente bolne informacije koja dolazi iz različitih izvora na periferiji (Bushnell, 1995.). Međutim, talamus nije krajnja točka prijenosa, nego je povezan s različitim područjima korteksa koja su odgovorna za **percepciju** pojedinih komponenti boli: senzorno-diskriminativne, afektivno-motivacijske i kognitivne. To su primarna i sekundarna somatosezorna kora, prednja cingularna kora, stražnja inzularna kora i prefrontalna kora (Tracey i Mantyh, 2007.). Prema tehnikama oslikavanja (PET, fMRI) sva se ova područja aktiviraju prilikom bolne stimulacije kod ljudi (Besson, 1999.). Tako zapravo ne postoji specifičan nocicepcijski put i centar za bol u mozgu, već je uključenost svih spomenutih regija mozga odgovorna za nastanak višedimenzionalnog iskustva boli.

Osim uzlaznih putova koji završavaju u talamusu, važni su i putovi koji, preko parabrahijalne jezgre (PB), završavaju u amigdali i ventralnoj medijalnoj jezgri hipotalamusa (Millan,

1999.) te posreduju emocionalno-afektivnu komponentu boli, ali i silaznu modulaciju bolne informacije na spinalnoj razini (Slika 2).



**Slika 2 Prijenos bolnog podražaja od nociceptora do nocicepcijskih regija u mozgu** (D'Mello i Dickenson, 2008.) Primarna aferentna vlakna (A $\beta$ , A $\delta$  i C vlakna) prenose podražaje s periferije kroz ganglije dorzalnih korjenova (DRG) u dorzalni rog kralješnične moždine. Nocicepcijski specifični (NS) neuroni većinom se nalaze u površinskim laminama (I i II), dok je većina neurona širokog raspona (WDR) smještena u lamini V. Projekcijski neuroni iz lamine I inerviraju parahijalnu (PB) jezgru, odakle se impulsi prenose u limbička područja mozga. Limbički sustav je u vezi sa sivom tvari oko akvedukta (PAG), od kuda polaze silazni putovi, preko rostralne ventromedijalne medule (RVM), koji moduliraju prijenos bolne informacije u dorzalnom rogu (žute linije). Neuroni iz lamine V većinom se projiciraju u talamus (spinalotalamički trakt), odakle se aktiviraju različite kortikalne regije (primarna i sekundarna somatosezorna, inzularna, prednja cingularna i prefrontalna kora), koje zajedno nazivamo "bolnim matriksom" (engl. „*pain matrix*“).

### 1.1.2.1 Transmisija bolnog podražaja: neurotransmitori pri nocicepciji

Glavni ekscitacijski neurotransmitor svih neurona u nocicepcijskom putu je glutamat, koji djeluje preko ionotropnih AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kiselina), NMDA (N-metil-D-aspartat) i kainatnih te metabotropnih mGlu receptora na perifernim i središnjim završecima primarnih aferentnih neurona te neurona drugog (Carlton,

2001.) i trećeg reda (Millan, 1999.). Prijenos brze nocicepcijske boli ostvaruje se vezanjem glutamata za AMPA i kainatne, dok u uvjetima učestalog ulaza impulsa s periferije i za NMDA receptore (vidi: Središnja senzitivacija).

Osim glutamata, iz središnjih završetaka primarnih aferentnih neurona luče se i tvar P (engl. *Substance P*, SP), polipeptid kalcitoninskog gena (engl. *Calcitonin Gene-Related Peptide*, CGRP), somatostatin, čimbenik lučenja kortikotropina (engl. *Corticotropin Releasing Factor*, CRF), kolekistokinin, 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 senzitiviraju nociceptore, poput bradikinina, histamina i serotonina. U upalnoj su boli upalne stanice na mjestu ozljede izvor i endogenih opioidnih peptida s inhibicijskim učinkom na nocicepciju (Hua i Cabot, 2010.).

U dorzalnom rogu kralješnične moždine aktivirane glija stanice luče tvari poput adenozintrifosfata (ATP), dušikovog oksida (NO), prostaglandina, neurotrofnog čimbenika porijeklom iz mozga (engl. *Brain-Derived Neurotrophic Factor*, BDNF), čimbenika rasta neurona (engl. *Nerve Growth Factor*, NGF) i citokina/kemokina, koje mogu djelovati pro- ili anti-nocicepcijski, čime se transmisija na razini dorzalnog roga dodatno komplicira (Milligan i Watkins, 2009.; Ji i sur., 2013.).

Ekscitacijski interneuroni djeluju preko ekscitacijskih aminokiselina, SP, neurotenzina i VIP-a, dok inhibicijski preko  $\gamma$ -amino-maslačne kiseline (GABA), glicina (Gly), acetilkolina, enkefalina i dinorfina. Iz supraspinalnih se putova u dorzalni rog luče endogeni opioidni peptidi i noradrenalin (NA) (Fields, 2004.), a moguće i endogeni kanabinoidi (Palazzo i sur., 2010.), s inhibicijskim djelovanjem na nocicepciju, te serotonin koji ovisno o receptorima i neuronima na koje djeluje može imati i pro- i anti- nocicepcijske učinke (Ossipov i sur., 2010.).

### **1.1.2.2 Modulacija prijenosa bolnog podražaja**

Intenzitet odgovora na bolni podražaj može biti moduliran na različitim razinama prijenosa (Moayed i Davis, 2013.), ali središnje mjesto modulacije odvija se u dorzalnom rogu, kako je niže opisano.

I. Prema teoriji nadziranog ulaza (engl. *gate control theory*), koju su 1965. predložili Melzack i Wall, aktivnost nocicepcijskih A $\delta$  i C vlakana i nenocicepcijskih A $\beta$  vlakana kontrolira transmisiju bolne informacije prema mozgu. Naime, podraživanje A $\beta$  vlakana na mjestu ozljede (primjerice dodirrom, trljanjem, vibracijom) aktivira inhibicijske interneurone u

želatinoznoj tvari, koji luče inhibicijske neurotransmitore te tako umanjuju prijenos bolne informacije s nocicepcijskih A $\delta$  i C vlakana na projekcijski neuron.

Postoje neurokemijski različiti inhibicijski interneuroni, a glavni su GABA-ergički i glicinergički. Pritom, interneuroni smješteni u površinskim laminama I i II luče prvenstveno GABA-u, dok su u dubljim laminama zastupljeniji glicinergički interneuroni (Foster i sur., 2015.). GABA-ergički interneuroni dodatno pokazuju različit obrazac kolokalizacije s drugim inhibicijskim neurotransmitorima: glicinom, acetilkolinom i enkefalinima (Millan, 1999.). Inhibicijsko djelovanje na spinalnu nocicepcijsku transmisiju GABA najvećim dijelom ostvaruje preko GABA<sub>A</sub> receptora, koji se nalaze na središnjim završecima primarnih aferentnih neurona (presinaptički) i na sekundarnim aferentnim neuronima (postsinaptički) (Zeilhofer i sur., 2012.). Vežući se na presinaptičke receptore GABA inhibira lučenje glutamata i neuropeptida (presinaptička inhibicija), dok vezanjem postsinaptički na projekcijski neuron uzrokuje njegovu hiperpolarizaciju, zbog čega postaje manje podražljiv (postsinaptička inhibicija). Slično je i s glicinom, kao i inhibicijskim neurotransmitorima koji se oslobađaju iz silaznih supraspinalnih putova (noradrenalin, serotonin i endogeni opioidni peptidi).

II. Silazni putovi iz mozga mogu inhibirati ili pojačavati transmisiju u dorzalnom rogu kralješnične moždine. Glavno supraspinalno mjesto uključeno u modulaciju boli na spinalnoj razini je siva tvar oko akvedukta u mezencefalonu (engl. *Periaqueductal Gray matter*, PAG), koja je izvor opioidima posredovane silazne inhibicije. U vezi je s višim centrima u mozgu, poput amigdale i prednjeg cingularnog korteksa, ali i s projekcijskim neuronima iz kralješnične moždine preko parabrahijalne jezgre (PB) (slika 2; Ossipov i sur., 2010.). PAG na silaznu modulaciju utječe primarno preko rostralne ventromedijalne (RVM) jezgre, odakle silazna vlakna preko dorzolateralnog funikula (DLF) sinaptički završavaju na neuronima površinskih lamina dorzalnoga roga (Gebhart, 2004.). U RVM se nalaze i *raphe magnus* jezgre, od kuda aksoni serotoninergičkih neurona također silaze u dorzalni rog, duž spinalnog DLF (Stamford, 1995.). Uz endogene opioidne peptide i serotonin, noradrenalin je treći najvažniji neurotransmitor u silaznoj modulaciji. Noradrenergički aksoni u dorzalni rog dolaze iz *locus coeruleus*-a (LC) (Stamford, 1995.).

Odnosi između silaznih inhibicijskih i facilitacijskih utjecaja kompleksni su ne samo u stanjima patološke boli, nego i fiziološke boli (Vanegas i Schaible, 2004.). Djelovanje silaznih putova na spinalnu transmisiju ovisi o vrsti neurona u dorzalnom rogu na koji djeluju izravno (projekcijski neuron, središnji završetak primarnog aferentnog neurona) ili neizravno (ekscitacijski i inhibicijski interneuron), kao i o podskupinama receptora na koje se

neurotransmitori vežu. Endogeni opioidni peptidi, koji se u dorzalnom rogu luče iz silaznih inhibicijskih putova iz PAG-a ili RVM, ostvaruju inhibicijski učinak na nocicepcijsku transmisiju vezanjem za presinaptičke i postsinaptičke opioidne  $\mu$ -,  $\kappa$ - i  $\delta$ - receptore (Fields, 2004.).

Noradrenalin ima inhibicijski učinak na transmisiju u dorzalnom rogu aktivacijom spinalnih  $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora presinaptički i postsinaptički (Stamford, 1995.). Učinak serotonina na nocicepciju u dorzalnom rogu vjerojatno predstavlja najsloženiji dio silazne modulacije: aktivacijom 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub> i 5-HT<sub>7</sub> receptora serotonin ostvaruje inhibicijski učinak na nocicepciju, dok vezanjem na 5-HT<sub>2A</sub> i 5-HT<sub>3</sub> pojačava prijenos bolne informacije (Ossipov i sur., 2010.).

### 1.1.3 Podjela boli

Bol može biti različitog intenziteta (blaga, umjereno jaka i jaka), kvalitete (oštra, žareća, tupa), trajanja (akutna, subakutna, kronična), područja koje zahvaća (površinska ili duboka, lokalizirana ili difuzna) i porijekla (kutana, mišićna, visceralna).

Prema etiologiji razlikujemo 4 vrste boli: nocicepcijsku, upalnu, neuropatsku i disfunkcionalnu (Woolf, 2010.), čija su osnovna svojstva navedena u tablici 1.

**Tablica 1 Vrste, trajanje, glavne karakteristike i izvori boli** (modificirano prema Millan, 1999., Woolf, 2010.)

Vrsta boli	Trajanje	Glavne karakteristike	Izvor boli	Primjer
<b>Nocicepcijska</b>	Sekunde	Akutna bol intenziteta i trajanja proporcionalnog uzroku	Aktivacija nociceptora podražajem visokog intenziteta	Akutni bolni podražaj termalnog (>47°C), mehaničkog (pritisak, ubod) ili kemijskog karaktera
<b>Upalna</b>	Sati – dani	Primarna i sekundarna hiperalgezija, alodinija	Aktivacija nociceptora podražajem i upalnim medijatorima	Upalni artritis
<b>Neuropatska</b>	Mjeseci – godine	Primarna i sekundarna hiperalgezija, alodinija Spontana bol Parestezije i disestezijske Izražena afektivna komponenta	Ozljeda živca te različiti periferni i središnji mehanizmi	Neuralgija Periferne i središnje neuropatije
<b>Disfunkcionalna</b>	Mjeseci – godine	Kronična raširena ili regionalna hiperalgezija	Nepoznat	Fibromialgija, intersticijski cistitis

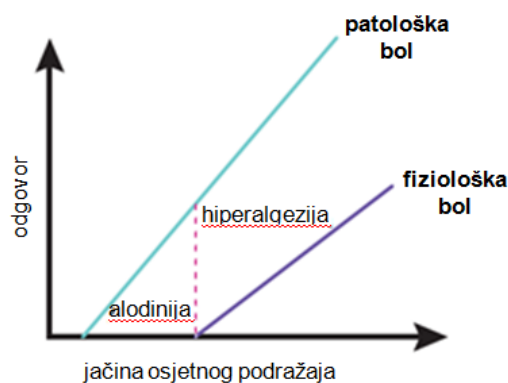
U neke kliničke bolne sindrome, poput kronične križobolje mogu biti uključeni etiološki različiti mehanizmi: i aktivacija mišićno-koštanih nociceptora i disfunkcija živaca (Förster i sur., 2013.).

Šira bi podjela uključivala samo 2 kategorije, fiziološku i patološku bol (Woolf , 2009.). Fiziološka je ona bol koja ispunjava svoju temeljnu ulogu u upozoravanju organizma na moguću ozljedu ili potiče cijeljenje ukoliko se ona dogodila. Prema tome, ovu funkciju imaju nocicepcijska i upalna bol. S druge strane, upalna bol može trajati i nakon uklanjanja uzroka boli i završetka procesa cijeljenja, te je u ovom obliku patološka. Neuropatska bol koja je posljedica ozljede ili disfunkcije perifernog ili središnjeg živčanog sustava uvijek je patološka, kao i boli svrstane u kategoriju disfunkcionalnih, poput fibromialgije, sindroma iritabilnog kolona i sl. (Woolf, 2010.). Glavno svojstvo patološke boli je bolna preosjetljivost koja nastaje kao posljedica kompleksnih središnjih promjena u obradi bolne informacije. Neke od njih, poput strukturnih promjena i reorganizacije sinapsi, smatraju se i ključnim uzrokom dugotrajnosti boli (Kuner i Flor, 2017.).

### 1.1.3.1 Vrste bolne preosjetljivosti

Bolna preosjetljivost glavni je klinički simptom bolnih stanja različite etiologije. Nastaje kao posljedica različitih perifernih i središnjih mehanizama. Razlikujemo (Slika 3):

- **hiperalgeziju**, povećanu osjetljivost na bolne podražaje.
- **alodiniju**, povećanu osjetljivost na podražaje koji nisu bolni (poput dodira).



Slika 3 Shematski prikaz hiperalgezije i alodinije kod patološke boli (Kuner, 2010.)

Hiperalgezija i alodinija mogu biti: a) **primarne** – ograničene na mjesto upale/ozljede živca i b) **sekundarne** – proširene izvan mjesta ozljede. Bol se može i specifično proširiti na homologno mjesto na strani tijela suprotnoj izazivanju ozljede. Ovaj se fenomen naziva

**bilateralna bol.** Može se izazvati različitim vrstama ozljeda, posebno mišića, zglobova ili živaca, u eksperimentalnih životinja (Koltzenburg i sur., 1999.; Shenker i sur., 2003.). Učestalost ovog poremećaja kod ljudi nije poznata, iako je opisan u brojnim prikazima slučajeva; ili kao bilateralna bol u sklopu kroničnih bolnih sindroma (Koltzenburg i sur., 1999.; Shenker i sur., 2003.) ili kao promjena senzorne percepcije kontralateralno u odnosu na ozljedu perifernog živaca na drugoj strani tijela (Konopka i sur., 2012.). Općenito, mehanizmi nastanka bilateralne boli nisu poznati, kao ni anatomske putove koji bi doprinosili prijenosu boli s jedne na drugu stranu.

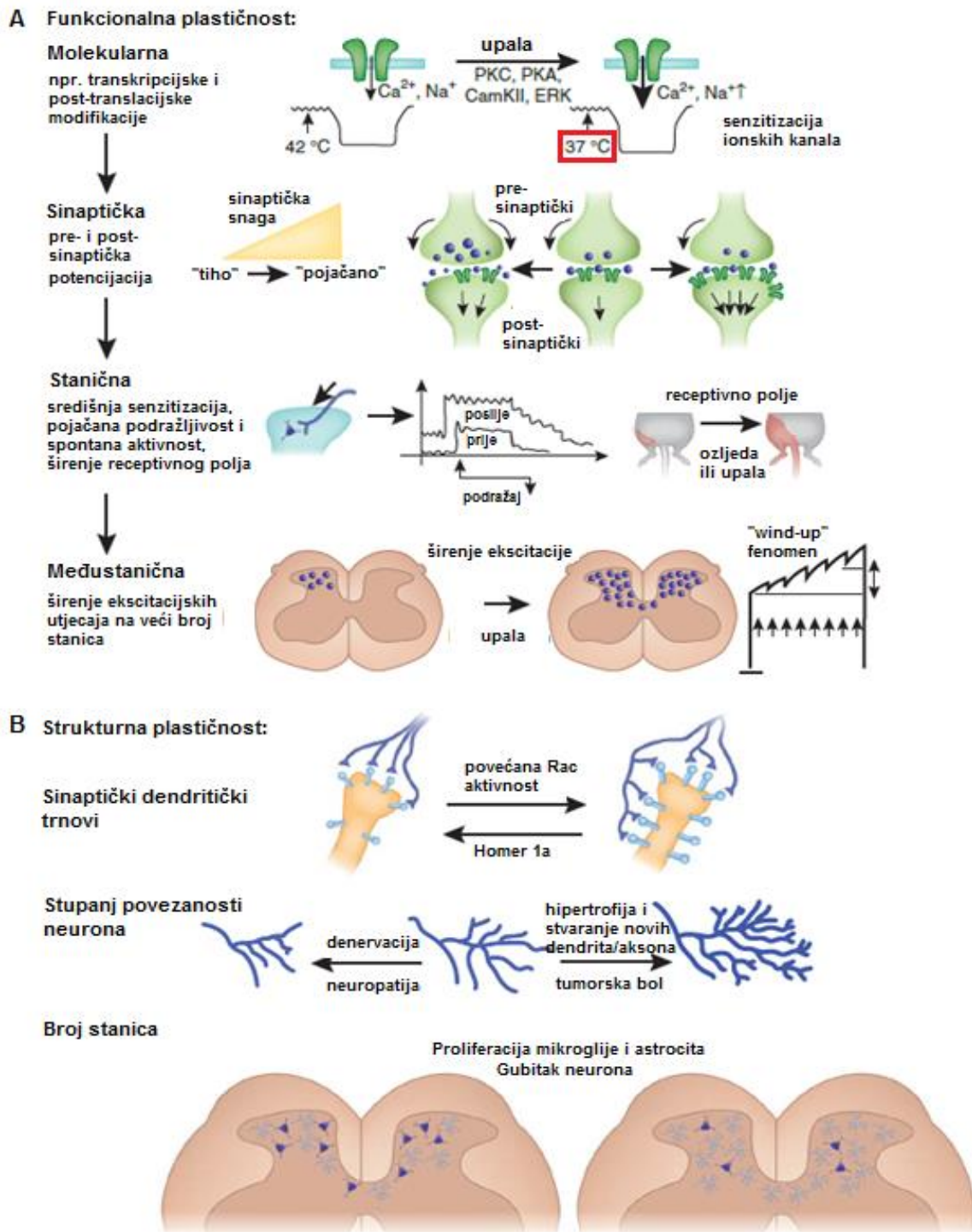
#### 1.1.4 Senzitizacija kao uzrok bolne preosjetljivosti

Senzitizacija nastaje u uvjetima produljenog izlaganja bolnom podražaju i uzrokuje smanjenje praga za aktivaciju nociceptora (**periferna senzitivacija**) te se odgovori na posljedične podražaje na razini SŽS-a pojačavaju (**središnja senzitivacija**). Odras je neuronalne plastičnosti, odnosno prilagodbe senzornih neurona na vanjske utjecaje (Sandkühler, 2009.). Nekoliko je oblika **funkcionalne** i **strukturne plastičnosti** koja može senzitivirati središnji nocicepcijski sustav i potaknuti bolnu preosjetljivost u fiziološkim i patološkim uvjetima (Kuner, 2010.).

Funkcionalna se plastičnost može promatrati na:

- a) molekularnoj razini: transkripcijske i translacijske promjene (poput fosforilacije);
- b) sinaptičkoj razini: presinaptička i postsinaptička potencijacija;
- c) staničnoj razini: pojačana podražljivost projekcijskih neurona, širenje receptivnog polja;
- d) međustaničnoj razini: širenje ekscitacijskih utjecaja na sve veći broj neurona dorzalnog roga.

Oblici strukturne plastičnosti, koja bi mogla biti vjerojatni uzrok kroničnosti boli, uključuju promjene poput degeneracije neurona, a proliferacije glija stanica te denervacije, nicanja novih aksona i hipertrofije u perifernom tkivu ljudi i eksperimentalnih životinja s tumorskom i neuropatskom boli (Kuner, 2010.). Kod neuropatske je boli također uočeno i stvaranje novih dendritičkih trnova pojačanom aktivnošću malih GTPaza Rho obitelji unutarstaničnih proteina, poput Rac1 (Tan i sur., 2008), koji definiraju snagu ekscitacijske sinaptičke transmisije (Hofer i Bonhoeffer, 2010.) te bi mogli biti povezani i sa dugotrajnim pamćenjem (Yang i sur., 2009.).



**Slika 4 Patološka funkcionalna i strukturna plastičnost u nocicepcijskom sustavu (Kuner, 2010.).** A) Molekule se mogu funkcionalno senzitivirati (fosforilacija), sinaptička se transmisija može pojačati pre- i post-sinaptičkim mehanizmima, stanice mogu odgovarati na bolni podražaj s pojačanom aktivnošću ili proširenim receptivnim područjem nakon ozljede, a funkcioniranje mreže neurona se može promijeniti tako da ih više odgovara na bolni podražaj, dovodeći do povećanja izlaznih informacija iz dorzalnog roga nakon ozljede ili upale. B) Sinaptički dendritički trnovi mogu se povećati brojem i veličinom, aksoni mogu nicati ili degenerirati, stanice mogu atrofirati (npr. inhibicijski interneuroni) ili proliferirati (npr. glija stanice). *PKA* i *PKC*–protein kinaze A i C, *CaMKII*–o kalmolidinu ovisna protein kinaza, *ERK*–kinaze regulirane izvanstaničnim signalima, *Rac*–GTPaza porodice Rho proteina (regulira stvaranje dendritičkih trnova), *Homer 1a*–kratkolančana varijanta Homer proteina (blokira interakciju dugolančanih formi 1b i 1c s ligandima)



#### ***1.1.4.1 Mehanizmi periferne senzitivacije***

Periferna senzitivacija je stanje povećane podražljivosti nociceptora uslijed njihove izloženosti upalnim medijatorima i tvarima iz oštećenog tkiva, te je stoga ograničena na mjesto ozljede. Pritom neke tvari izravno aktiviraju nociceptore, poput tvari koje se oslobađaju iz oštećenih stanica (ATP i K<sup>+</sup> ioni) ili vodikovi ioni, a neke ih senzitiviraju (prostaglandini, NGF). Bradikinin, primjerice, može i izravno aktivirati i senzitivirati nociceptore.

Molekularni mehanizam periferne senzitivacije posredovan je metabotropnim receptorima spregnutim s G-proteinima na membranama perifernih aferentnih završetaka te aktivacijom protein kinaza A i C (PKA, PKC) koje fosforiliraju ionske kanale i receptore. Time se smanjuju pragovi za njihovu aktivaciju, a podražljivost membrane nociceptora se povećava. Kako je prethodno navedeno, u ovim uvjetima dolazi i do aktivacije tihih nociceptora. Periferna senzitivacija ima sličnu ulogu i u neuropatskoj boli, gdje na mjestu ozljede i degeneracije neurona nastaje upalni odgovor koji uključuje acidozu i infiltraciju stanicama imunološkog sustava.

Periferna senzitivacija odgovorna je za nastanak središnje senzitivacije i primarne hiperalgezije u upaljenom tkivu, ali se pretpostavlja da u patološkoj boli, posebno kronične prirode, više nema značajnu ulogu (Woolf, 2010.).

#### ***1.1.4.2 Mehanizmi središnje senzitivacije***

Središnja senzitivacija podrazumijeva povećanu podražljivost projekcijskih neurona u dorzalnog rogu kralješnične moždine koja nastaje kao posljedica periferne senzitivacije i učestalog ulaza informacija s periferije. Za razliku od periferne senzitivacije, uključuje i nove komponente u nocicepcijske putove, primjerice A $\beta$ -mehanoreceptore, koji inače ne prenose bolne podražaje. Osim toga, odgovorna je i za prostorne promjene u osjetu boli, kao što je nastanak sekundarne bolne preosjetljivosti (izvan mjesta ozljede). Središnja je senzitivacija početno potaknuta ulaznom informacijom s periferije, a prema promjenama koje uključuje, može biti brza i odgođena (Ji i sur, 2003.).

Kako je prethodno spomenuto, u akutnoj nocicepcijskoj boli učinak glutamata preko AMPA receptora depolarizira projekcijski neuron omogućujući brzi prijenos bolne informacije. U ovom slučaju nije moguće aktivirati NMDA receptor, jer je u fiziološkim uvjetima blokiran Mg<sup>2+</sup> ionima. Međutim, u slučaju učestale stimulacije nocicepcijskih C vlakana uz glutamat se luče i neuropeptidi poput SP, neurokinina A i CGRP-a. Vežući se za postsinaptičke

receptore uzrokuju kumulativnu depolarizaciju projekcijskih neurona, što uklanja blokadu NMDA receptora i omogućuje prolaz  $\text{Ca}^{2+}$  ionima. Uz glutamat i neuropeptide u nastanku brze središnje senzitivacije sudjeluju još i NO, bradikinin i BDNF (Latremoliere i Woolf, 2009.).

Porast unutarstanične razine  $\text{Ca}^{2+}$  u projekcijskom neuronu dorzalnog roga utokom kroz NMDA receptor smatra se ključnim pokretačem središnje senzitivacije. Utok  $\text{Ca}^{2+}$  može se dogoditi i preko AMPA receptora s permeabilnim GluR1 i GluR3 podjedinicama te preko  $\text{Ca}^{2+}$  kanala ovisnih o naponu (Latremoliere i Woolf, 2009.).  $\text{Ca}^{2+}$  aktivira unutarstanične kinaze dovodeći do fosforilacije NMDA i AMPA receptora što povećava aktivnost i membransku gustoću ovih receptora te konačno uzrokuje postsinaptičku hiperpodražljivost. Osim toga, posljedica aktivacije protein kinaza jest i aktivacija neuronalne NO sintaze i stvaranje NO koji djeluje kao retrogradni glasnik: difuzijom u presinaptički završetak doprinosi daljnjem lučenju glutamata (Wu i sur., 2001.). Uz jačanje ekscitacijskih procesa, važna je i komponenta fosforilacije koja smanjuje inhibicijske utjecaje GABA-e i Gly u dorzalnog roga te silaznu inhibiciju iz PAG-a (Latremoliere i Woolf, 2009.).

Nakon ovih ranih promjena koje dovode do promjena u distribuciji i funkciji postojećih proteina, u središnjim se neuronima događaju promjene u genskoj regulaciji, posljedica čega je sinteza novih proteina. Neke su od ovih odgođenih promjena ograničene na dijelove SŽS-a koji primaju informacije iz ozlijeđenog tkiva, poput pojačane ekspresije dinorfina, dok se neke aktiviraju šire, poput ekspresije ciklooksigenaze COX-2. Nastanak COX-2 inducira interleukin  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), koji s periferije ulazi u cerebrospinalnu tekućinu (engl. *CerebroSpinal Fluid*, CSF) (Samad i sur., 2001.). Prostaglandin  $\text{E}_2$ , produkt COX-2, vežući se na svoje pre- i post- sinaptičke  $\text{EP}_4$  receptore potiče sinaptičku transmisiju i povećava podražljivost doprinoseći kasnoj, produljenoj i difuznoj fazi središnje senzitivacije (Voscopoulos i Lema, 2010.).

Identificirano je nekoliko unutarstaničnih putova koji održavaju središnju senzitivaciju, a čini se da posebnu ulogu ima kinaza aktivirana mitogenom (MAPK), koja uključuje kinaze regulirane izvanstaničnim signalima ERK1 i ERK2 (engl. *Extracellular signal-Regulated Kinases*), te transkripcijski čimbenik koji se veže na element odgovora na cAMP (engl. *CAMP Response Element Binding protein*, CREB). Aktivacija ERK kinaze u MAPK signalizacijskom putu ima ključnu ulogu u fosforilaciji NMDA i AMPA receptora (Latremoliere i Woolf, 2009.). Primjerice, u kralješničnoj moždini ERK je aktiviran jedino u neuronima koji odgovaraju na perifernu jaku bolnu stimulaciju koja uzrokuje središnju senzitivaciju te se stoga smatra molekularnim markerom središnje senzitivacije (Gao i Ji,

2009.). Transkripcijske su promjene posredovane aktivacijom CREB-a, koji potiče transkripciju nekoliko gena poput c-FOS, NK1, TrkB i Cox-2 (Latremoliere i Woolf, 2009.). Smatra se da središnja senzitivacija nastaje i u talamusu te da uključuje mehanizme prethodno opisane na razini kralješnične moždine (Gangadharan i Kuner, 2013.).

### **1.1.5 Kako i kada nastaje patološka bol?**

Dok su mehanizmi nastanka primarne hiperalgezije donekle jasni, mehanizmi nastanka sekundarne hiperalgezije i alodinije (posebno mehaničke alodinije) složeni su i velikim dijelom nerazjašnjeni. Eksperimentalni dokazi upućuju da su zbivanja na periferiji (uslijed ozljede tkiva ili živaca) odgovorna za njihov nastanak, ali da jednom nastala preosjetljivost više nije ovisna o dolaznim informacijama s periferije (Millan, 1999.).

Središnja senzitivacija se može smatrati fenomenom s različitim procesima u podlozi, koji u odgovoru na dolazne bolne informacije u dorzalnog rogu mogu:

- a) povećati podražljivost postsinaptičkog projekcijskog neurona,
- b) pojačati sinaptičku snagu, i
- c) smanjiti inhibicijske utjecaje.

Tako su i efektori ove plastičnosti raznovrsni: promjene u pragu podražaja, aktivaciji i membranskoj gustoći NMDA i AMPA receptora, promjene u aktivnosti ionskih kanala ovisnih o naponu te smanjenje lučenja i aktivnosti GABA-e i Gly. Ove su promjene, međutim, kratkotrajne i reverzibilne. Fosfataze poništavaju djelovanje kinaza, ionski se kanali „resetiraju“, receptori se endocitozom uklanjaju s membrana (Latremoliere i Woolf, 2009.). Da bi nastale dugotrajne promjene, potrebne su promjene na razini genske regulacije, a one su posljedica dugotrajne ozljede tkiva ili ozljede živca i odraz su neprilagođene neuronalne plastičnosti (Latremoliere i Woolf., 2009.).

S obzirom da središnja senzitivacija mijenja svojstva neurona SŽS-a, osjet boli više nije ovisan o prisutnosti, intenzitetu i trajanju bolnog podražaja već nastaje abnormalno stanje facilitacije, potencijacije i pojačane aktivacije nocicepcijskog sustava (Latremoliere i Wolf, 2009.). No, mehanizmi odgovorni za održavanje ovog patološkog stanja, u kojemu je izgubljena diskriminacija između bolnog i ne-bolnog podražaja, nisu u potpunosti poznati. Složenost mehanizama nocicepcije te mogućnost njene modulacije na spinalnoj i supraspinalnoj razini ukazuje na kompleksnost potencijalnih mehanizama, od kojih su najvažniji navedeni u daljnjem tekstu.

### **1.1.5.1 Silazni neuronalni putovi doprinose facilitaciji boli**

Poremećaj funkcije silaznih inhibicijskih putova patološkim mehanizmima koji smanjuju inhibiciju i jačaju facilitaciju važan je u razvoju i održavanju bolne preosjetljivosti u patološkim stanjima, te bi mogao biti i važan čimbenik koji određuje hoće li bol postati kronična (Ossipov i sur., 2014.). Disfunkcija endogene silazne inhibicije pokazana je kod pacijenata s fibromialgijom (Ablin i Buskila, 2013.), sindromom iritabilnog kolona (Jarrett i sur., 2014.), osteoartritisom (Arendt-Nielsen i sur., 2010.) i reumatoidnog artritisa (Meeus i sur., 2015.). O ovim mehanizmima ne znamo puno. U eksperimentalnim modelima upalne i neuropatske boli čini se da postoji mješovit utjecaj silaznih putova, pri čemu kod primarne hiperalgezije dominiraju inhibicijski utjecaji, a kod sekundarne facilitacijski (Vanegas i Schaible, 2004.). Silazni inhibicijski noradrenergički put čini se posebno važnim u zaštiti od nastanka patološke boli (Ossipov i sur., 2014.). Primjerice, aktivnost noradrenergičkog silaznog sustava je pojačana u stanju ozljede živca: pojačana je sinteza i lučenje NA, kao i vezanje NA za spinalne  $\alpha_2$ -adrenergičke receptore (Muto i sur., 2012.). Smatra se da je to mehanizam analgetskog djelovanja klonidina i inhibitora ponovnog povrata serotonina i noradrenalina, poput duloksetina i milanci-prana, u dijabetičkoj neuropatiji, fibromialgiji i osteoartritisu (Ossipov i sur., 2014.).

### **1.1.5.2 Dezinhibicija u dorzalnog rogu**

Kako je predloženo teorijom nadziranog ulaza, inhibicijski interneuroni u dorzalnog rogu koji luče inhibicijske neurotransmitore GABA-u i Gly kontroliraju prolaz bolnih informacija prema mozgu. U skladu s time, smatra se da je gubitak ove inhibicije u dorzalnog rogu ključan u nastanku i održavanju patološke boli različite etiologije (Zeilhofer i sur., 2012.; Guo i Hu, 2014.; Prescott i sur., 2014.). Za razliku od mehanizma glutatom/NMDA receptorom posredovane senzitivacije, kojima se izravno povećava podražljivost neurona drugoga reda, dezinhibicijom se ona pojačava posredno. Mogući su uzroci dezinhibicije navedeni u nastavku.

**Inhibicija Gly receptora fosforilacijom.** U upalnoj boli prostaglandin  $E_2$  uzrokuje protein kinazom A posredovanu fosforilaciju i inhibiciju receptora za Gly na ekscitacijskim interneuronima i projekcijskim neuronima (Harvey i sur., 2004.). Posljedično, inhibicijski učinci Gly na ove neurone izostaju.

**Pojačana aktivnost PKC $\gamma^+$  interneurona.** PKC $\gamma^+$  interneuroni specifična su populacija ekscitacijskih interneurona u lamini II koji ekspimiraju  $\gamma$  izoformu protein kinaze C i tvore

lokalne neuronalne petlje, a primaju informacije mijeliniziranih nenocijepcijskih vlakana. U fiziološkim su uvjetima neaktivni, odnosno inhibirani glicinom (Alba-Delgado, 2015.). U uvjetima smanjene glicinergičke inhibicije, koja nastaje prilikom ozljede živca, PKC $\gamma^+$  interneuroni se aktiviraju te prenose taktilne informacije do nocijepcijskih neurona lamine I, čime se dodir pretvara u bol, tj. nastaje mehanička alodinija (Miraucourt i sur., 2007.).

**Poremećen kloridni gradijent u projekcijskim neuronima.** Neurotransmisija posredovana GABA-om ovisna je o unutarstaničnoj koncentraciji kloridnih iona, a nju određuje aktivnost kation-kloridnih suprijenosnika: NKCC1 (Na-K-2Cl) kojim kloridi ulaze u stanicu, te KCC2 i KCC3 (K-Cl) kojima kloridi izlaze iz stanice (Kahle i sur., 2008.). U stanju upalne i neuropatske boli mijenja se ekspresija ovih prijenosnika. Smanjena je ekspresija KCC2 čija je funkcija održavati nisku unutarstaničnu razinu klorida. Zbog toga se kloridi akumuliraju u projekcijskom neuronu što mijenja koncentracijski gradijent i električni potencijal ionskih kanala kroz koje prolaze kloridi, poput GABA<sub>A</sub> i Gly receptora. Kloridi, koji u normalnim uvjetima ulaskom u neurone hiperpolariziraju membranski potencijal i smanjuju njihovu podražljivost, zbog promjene koncentracijskog gradijenta postižu manji inhibicijski učinak. Smanjen inhibicijski učinak GABA-e i Gly prisutan je ne samo na projekcijskim neuronima, nego i središnjim završecima primarnih aferentnih neurona (Guo i Hu, 2014.).

**Gubitak GABA-ergičkih interneurona.** Selektivni gubitak GABA-ergičkih interneurona u dorzalnog rogu uočen je u eksperimentalnim modelima periferne neuropatske boli (Bardoni i sur., 2013.), kao i u uvjetima produljene upalne boli (Dubner i Ruda, 1992.). Do apoptoze dolazi već tjedan dana nakon ozljede živca (Moore i sur., 2002.), a može biti posljedica ekscitotoksičnog djelovanja glutamata i indukcije signalnih putova apoptoze (poput lučenja čimbenika nekroze tumora  $\alpha$  (engl. *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* , TNF $\alpha$ ) iz mikroglije) (Woolf, 2004.). Moguća je i atrofija inhibicijskih interneurona deprivacijom neurotrofnih čimbenika (BDNF, NGF), koji se u normalnim uvjetima luče iz središnjih završetaka primarnih aferentnih neurona (Oliveira i sur., 2002.).

### 1.1.5.3 Aktivacija glija stanica

Glija stanice (astrociti, mikroglija, oligodendrociti i radijalne stanice) čine čak 70% ukupnih stanica SŽS-a (Mika i sur., 2013.). U nocijepciji su najvažniji astrociti i mikroglija. Astrociti su najbrojnije stanice SŽS-a; pružaju strukturnu potporu neuronima, potiču stvaranje krvno-moždane barijere, doprinose sinaptičkoj transmisiji i održavaju homeostazu izvanstaničnog okoliša te potiču popravak neurona (Grace i sur., 2014.). Mikroglija stanice su tkivno-specifični fagociti SŽS-a te koordiniraju različite odgovore na ozljedu (Hanisch, 2013.).

Prema brojnim eksperimentalnim dokazima, patološka je bol praćena stanjem reaktivne glioze, što uključuje (Ji i sur., 2013.):

- povećan broj glija stanica, uključujući hipertrofiju i proliferaciju te promjenu njihove morfologije. Uobičajeni marker astroglioze je kiseli vlaknasti protein glije (engl. *Glial Fibrillary Acidic Protein*, GFAP), koji upućuje na promjenu morfologije, dok je mikroglia praćena ekspresijom CD11b (engl. *Cluster of Differentiation molecule 11b*) i upalnog čimbenika IBA1 (engl. *Ionized calcium-Binding Adapter molecule 1*),
- fosforilaciju unutarstaničnih signalnih proteina, primjerice u MAPK signalizacijskom putu,
- povećanje ekspresije ATP-a, purinergičkih i kemokinskih receptora, a smanjenje ekspresije glutamatnih prijenosnika,
- povećanje sinteze i lučenja medijatora iz glije (citokini, kemokini, faktori rasta i proteaze) koji su uključeni u modulaciju ekscitacijske i inhibicijske transmisije na pre-, post- i ekstrasinaptičkim mjestima.

Moguća posljedica glioze i lučenja medijatora koji djeluju na nocicepcijski sustav mjesecima nakon ozljede, te adaptacije u unutarstaničnim signalnim putovima je prijelaz akutne u kroničnu bol (Grace i sur., 2014.). Čini se da nakon ozljede živca ATP i kemokini (CX3CL1, CCL2 i CCL21), koji se luče iz primarnih aferentnih završetaka, aktiviraju pripadajuće receptore na mikrogliji (Grace i sur., 2014.). Purinergički P2X i P2Y receptori za ATP pritom imaju središnju ulogu u aktivaciji mikroglije i indukciji p38 MAPK signalnog puta, što dovodi do sinteze i lučenja brojnih proupalnih medijatora, poput katepsina S, BDNF, TNF $\alpha$  i IL-1 $\beta$  i IL-6, koji mijenjaju funkciju neurona (Gangadharan i Kuner, 2013.). BDNF iz mikroglije smanjuje ekspresiju KCC2 suprijenosnika u neuronima drugog reda, što doprinosi smanjenju inhibicijskog djelovanja GABA-e na postsinaptički neuron. TNF $\alpha$  aktivira specifične kinaze u astrocitima dovodeći do daljnje sinteze i lučenja IL-1 $\beta$ , CCL2 i matriksne metaloproteinaze 2 (MMP-2), koji moduliraju središnju senzitivaciju. Osim toga, TNF $\alpha$  aktivira i receptore na presinaptičkim završecima potičući lučenje glutamata (Park i sur., 2011). CCL2 i IL-1 $\beta$  iz astrocita, vežući se za pripadajuće receptore pre- i post- sinaptički, dovode do povećanog lučenja glutamata i pojačane aktivacije NMDA i AMPA receptora (Gao i Ji, 2010.). Katepsin S cijepa fraktalkin (CX3CL1), transmembranski protein na središnjem završetku primarnih aferentnih neurona. Topljivi fragment fraktalkina veže se za svoj receptor CX3CR1 na mikrogliji, što opet aktivira p38 MAPK signalni put te moguće uspostavlja modulacijsku petlju između neurona i glija stanica, za koju se pretpostavlja da doprinosi kroničnosti boli (Clark i Malcangio, 2014.).

#### 1.1.5.4 Strukturna reorganizacija

Središnji završeci primarnih aferentnih neurona koji prenose bolne podražaje nalaze se većinom u laminama I i II, dok oni osjetnih vlakana niskog praga podražaja, koji prenose osjet dodira, pritiska i vibracije, završavaju u dubljim laminama. U eksperimentalnih životinja pokazano je da nakon ozljede perifernih živaca dolazi do reorganizacije ovih putova: već nekoliko tjedana nakon ozljede primijećena je inervacija lamina I i II središnjim završecima primarnih aferentnih vlakana niskog praga podražaja (Gandgaharan i Kuner, 2013.). Ovim se fenomenom objašnjava dugotrajnost promjena kod neuropatije, kao i nastanak mehaničke alodinije (Gandgaharan i Kuner, 2013.). Nije poznato jesu li ove promjene reverzibilne.

#### 1.1.6 Liječenje boli

Većina lijekova koje danas koristimo u liječenju boli djeluju na nocicepcijske mehanizme koje već duže vrijeme poznajemo. To su klasični analgetici, a dijelimo ih u dvije osnovne skupine:

1. **Nesteroidni protuupalni lijekovi**, koji blokirajući enzim ciklooksigenazu (COX) na periferiji i u kralješničnoj moždini smanjuju sintezu prostaglandina. Djelotvorni su kod boli slabog do srednje jakog intenziteta;
2. **Opioidni agonisti**, koji djelujući u mozgu pojačavaju silaznu inhibiciju, u kralješničnoj moždini smanjuju lučenje ekscitacijskih neurotransmitora i podražljivost neurona dorzalnog roga, a na periferiji smanjuju perifernu senzitivaciju. Djelotvorni su kod boli jakog intenziteta.

Međutim, kod neuropatske, kao i kod disfunkcionalne boli, klasični analgetici većinom nisu djelotvorni (Dworkin i sur., 2010.). U liječenju takvih vrsta boli heterogene etiologije, patofiziologije i simptoma koristimo skupine lijekova koji nisu primarno analgetici, poput:

3. **tricikličkih antidepressiva** (nortriptilin, desipramin), koji imaju brojna farmakološka djelovanja na periferiji i SŽS-u, poput blokade ponovnog unosa NA i serotonina, izravne ili neizravne aktivacije opioidnih receptora, inhibicije aktivnosti histaminskih, kolinergičkih, serotoninergičkih, NMDA receptora i ionskih kanala te blokade ponovnog unosa adenozina (Turk i sur., 2011.); novijih **selektivnih inhibitora ponovnog unosa serotonina i noradrenalina** (duloksetin i milancipran) koji, u odnosu na prethodne, ne djeluju na adrenergičke i kolinergičke receptore te ionske Na<sup>+</sup> kanale, zbog čega uzrokuju manje neželjenih učinaka,

4. **antiepileptika** (gabapentin i pregabalin), koji inhibiraju lučenje ekscitacijskih neurotransmitora selektivno se vežući na  $\alpha 2\delta$  podjedinicu  $\text{Ca}^{2+}$  kanala na presinaptičkim živčanim završecima u mozgu i kralješničnoj moždini (Turk i sur., 2011.),
5. **lokalnih anestetika** (lidokain), koji blokiranjem  $\text{Na}^+$  kanala utječu na nastanak i/ili provođenje bolnih impulsa na periferiji i/ili u SŽS-u i tako stabiliziraju ili moduliraju funkciju nociceptora i drugih neurona u osjetnom putu (Sawynok, 2003.).

Koriste se također i tvari poput:

6. **TRPV1 agonista** (kapsaicin) u obliku topičkih transdermalnih terapijskih sustava, koji tijekom dugotrajne primjene uzrokuju defunkcionalizaciju C vlakana zbog prevelike koncentracije kalcija u neuronu i oštećenja mitohondrija (Anand i Blay, 2011.),
7. **zikotinida**, koji blokirajući N-tip  $\text{Ca}^{2+}$  kanala inhibira lučenje ekscitacijskih neurotransmitora u kralješničnoj moždini. Primjena je zbog nuspojava ograničena samo za teške oblike kronične boli intratekalnim putem (Gangadharan i Kuner, 2013.).

U fazama razvoja i istraživanja su potencijalne molekule s analgetskim učinkom koje djeluju kao TRPV1 antagonisti, inhibitori glija stanica (minociklin, ibudilast), antagonisti CGRP-a, antagonisti neurokininskih NK-1 receptora, kanabinoidi te monoklonska protutijela za NGF (Gangadharan i Kuner, 2013.).

Unatoč različitim farmakološkim mogućnostima, svi navedeni lijekovi djeluju kratkotrajno, zbog čega liječenje kronične boli zahtijeva njihovu dugotrajnu i učestalu primjenu, a ona je često povezana s neugodnim nuspojavama. **Botulinum toksin tipa A (BT-A)** je za sada jedini lijek koji u različitim eksperimentalnim i kliničkim istraživanjima ima dugotrajni učinak (više tjedana pa i mjeseci) (Jabbari i Machado, 2011.).



## **1.2 BOTULINUM TOKSIN TIPA A: OD BOTULIZMA DO LIJEČENJA BOLI**

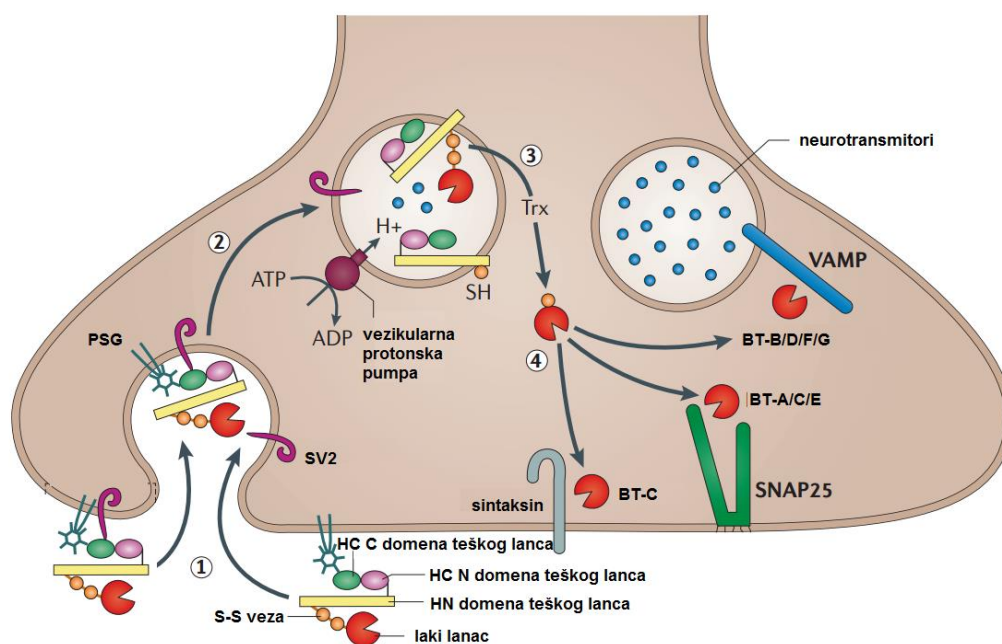
Botulinum toksin tipa A najpotentniji je otrov u prirodi. Stvara ga bakterija *Clostridium botulinum* u anaerobnim uvjetima, uz još 7 serotipova (B–H). Serotip H je nedavno pronađen te je u fazi karakterizacije (Barash i Arnon, 2014.). Procjenjuje se da je letalna količina BT-A za čovjeka oko 70 µg kod peroralnog unošenja, 0.09-0.15 µg uslijed intravenske i intramuskularne primjene, te 0.70-0.90 µg ako se inhalira. 1 g toksina inhalacijskim bi putem unosa mogao ubiti više od milijun ljudi, zbog čega predstavlja prijetnju kao potencijalno bojno oružje (Arnon, 2001.). S druge strane, potencijal njegove primjene u kliničkoj praksi kontinuirano raste. Već više od 30 godina pročišćeni BT-A koristi se u pikomolarnim dozama u liječenju različitih kliničkih stanja praćenih povećanom kontraktilnošću mišića. Terapijsku je korist omogućilo otkriće mehanizma kojim BT-A uzrokuje trovanje, odnosno botulizam, te mogućnost lokalne primjene malih doza u zahvaćeni mišić, gdje s velikom selektivnošću ulazi u završetke motoneurona. U međuvremenu je pokazano da BT-A djeluje i na parasimpatičke neurone, što je proširilo primjenu BT-A na liječenje autonomnih poremećaja. Temeljem istraživanja o učincima na senzorne neurone primjena BT-A se danas istražuje za liječenje različitih bolnih stanja kroničnog trajanja, o čemu će u nastavku biti više govora. Temeljna istraživanja tijekom posljednjih 15-ak godina pokazala su da učinci BT-A nisu samo lokalni, te da nakon lokalne primjene toksin ili njegov fragment putuje u SŽS retrogradnim aksonalnim transportom (Matak i Lacković, 2014.). Nije jasno, niti su istražene posljedice njegovog djelovanja u SŽS, za razliku od dobro karakteriziranog lokalnog učinka na kolinergičkoj mišićno-živčanoj spojnici i u autonomnim sinapsama. No, svakako bi mogle biti značajne za nove indikacije, posebno one koje uključuju kroničnu bolnu preosjetljivost.

### **1.2.1 Struktura BT-A i mehanizam djelovanja**

BT-A sintetizira *C. botulinum* kao kompleks od 900 kDa. Najveći dio tog molekularnog kompleksa čine netoksični hemaglutini i drugi proteini. Oni su fiziološki neaktivni, a smatra se da štite biološki aktivni dio molekule od proteolize i denaturacije pri visokoj temperaturi ili kiselom pH, odnosno prilikom prolaska kroz probavni sustav i u izvanstaničnom prostoru (Gu i Jin, 2013.). Nakon ulaska u krvotok, biološki aktivni dio kompleksa (150 kDa) putuje izvanstaničnom tekućinom do perifernih živčanih završetaka. Sastavljen je od dva polipeptidna lanca povezana disulfidnom vezom, od kojih svaki ima posebnu zadaću. Veći, teži lanac (100 kDa) sadrži:

- a) **receptor-vežuću domenu** (na karboksilnom kraju) pomoću koje se veže na akceptorske molekule na živčanom završetku (poligangliozide, SV2 proteine (engl. *Synaptic Vesicle protein 2*) i receptor za faktor rasta fibroblasta 3), nakon čega dolazi do endocitoze. Ovaj je proces pojačan u stanju neuronalne aktivnosti koja potiče recikliranje sinaptičkih mjehurića (vezikula) (Harper i sur., 2011);
- b) **translokacijsku domenu** (na amino kraju) koja translocira laki lanac u citoplazme. Ova se domena ugrađuje u membranu endosoma, a pod utjecajem kiselog pH u endosomu disulfidna veza se reducira, čime se kratki lanac odvajaju od dugog (Rossetto i sur., 2014.).

Manji, lakši lanac (50 kDa) je o cinku-ovisna proteaza koja cijepa SNAP-25 (engl. *SyNaptosomal Associated Protein of 25 kDa*), jedan od triju proteina iz kompleksa SNARE proteina (engl. *Soluble N-ethylmaleimid-sensitive factor Attachment Protein REceptor*).



**Slika 5** Ulaz BT-A u presinaptički živčani završetak i prikaz mehanizma djelovanja u odnosu na druge serotipove (Rossetto i sur., 2014.): 1) vezanje karboksilnog kraja domene teškog lanca ( HC-C domena) za poligangliozide (PSG) i SV2 na presinaptičkoj membrani.; 2) endocitoza BT-A u sinaptičke mjehuriće uz potrošnju ATP-a aktivnošću vezikularne protonske pumpe. Zakiseljavanjem sinaptičkih mjehurića, BT-A se protonira što uzrokuje 3) translokaciju lakog lanca iz sinaptičkog mjehurića u citoplazmu. Laki lanac se oslobađa s HN domene djelovanjem tioredoksin reduktaza-tioredoksinog sustava (TrxR–Trx), što cijepa disulfidnu (S-S) vezu; 4) Laki lanac serotipova B, D, F i G cijepaju VAMP, A i E SNAP-25, C cijepa SNAP-25 i sintaksin, što uzrokuje inhibiciju lučenja neurotransmitora.

Uz SNAP-25, ostali važni proteini koji čine ovaj kompleks su sinaptobrevin ili VAMP (engl. *Vesicle-Associated Membrane Protein*) i sintaksin. Oni su ciljna mjesta djelovanja drugih

serotipova botulinum toksina: serotipovi B, D, F i G cijepaju VAMP, a serotip C cijepa sintaksine. Osim BT-A, SNAP-25 cijepaju i BT-C i BT-E, ali na različitim mjestima.

Međusobna interakcija funkcionalnih SNARE proteina ključna je tijekom o  $Ca^{2+}$  ovisne egzocitoze neurotransmitora, s obzirom da dovodi do spajanja membrane sinaptičkog mjehurića i presinaptičkog neurona. Proteolitički pocijepani SNAP-25, s devet aminokiselina manje od potpunog SNAP-25, ne može vezati druge SNARE-proteine (Blasi i sur., 1993.). Posljedično je inhibirana egzocitoza neurotransmitora. Inhibicija lučenja acetilkolina na živčano-mišićnoj spojnici i u autonomnim sinapsama dobro objašnjava mišićnu paralizu, suhoću usta, zamagljen vid i druge tipične antikolinergičke simptome botulizma (Sobel, 2005.).

Osim učinka na acetilkolin, pokusi na staničnim kulturama i izoliranim organima pokazali su da BT-A može inhibirati egzocitozu i drugih neurotransmitora, poput serotonina, noradrenalina, dopamina, glutamata, GABA-e, Gly, SP, ATP-a i CGRP-a (Nakov i sur., 1989.; McMahon i sur., 1992.; Welch i sur., 2000.; Morris i sur., 2002.; Durham i Cady, 2004.; Verderio i sur., 2007.).

### **1.2.1.1 Mogući dodatni učinci BT-A**

- ***Učinci na egzocitozu iz ne-neuronalnih stanica***

Osim iz neuronalnih sustava, *in vitro* pokusima je pokazano da BT-A može inhibirati lučenje neurotransmitora ovisno o SNAP-25 i iz ne-neuronalnih stanica, poput inhibicije lučenja glutamata iz satelitskih glija stanica (da Silva i sur., 2015.), acetilkolina iz Schwanovih (Marinelli i sur., 2012.) i kromafinih stanica (Lawrence i sur., 2002.) te inzulina iz  $\beta$ -stanica gušterače (He i sur., 2008.). Značaj ovih nalaza nije jasan, no inhibicija lučenja glutamata iz satelitskih glija stanica mogla bi biti uključena u antinociceptivno djelovanje BT-A (da Silva i sur., 2015.), a inhibicija lučenja acetilkolina iz Schwanovih stanica u regenerativno djelovanje BT-A nakon ozljede živca (Marinelli i sur., 2012.).

- ***Fiziološki učinci SNAP-25***

Osim uključenosti u neuroegzocitozu, SNAP-25 protein ima dodatne funkcije, poput regulacije aktivnosti  $Ca^{2+}$  kanala (Ji i sur., 2002.; Condliffe i sur., 2010.) te moguće drugih o naponu ovisnih ionskih kanala; zatim, posredovanje umetanja receptora u plazmatsku membranu, poput TRPV1 (Morenilla-Palao i sur., 2004.) i NMDA (Lau i sur., 2010.; Cheng i sur., 2013.) receptora, ili internalizacije receptora, poput kainatnih receptora (Selak i sur.,

2009.) te koordinacije lučenja i ponovnog povrata GABA-e modulirajući GAT1 (engl. *GABA transporter 1*) prijenosnik (Fan i sur., 2006.). Od navedenih učinaka za sada najviše eksperimentalnih dokaza ukazuje da BT-A smanjuje ekspresiju TRPV1 receptora (Apostolidis i sur., 2005.; Shimizu i sur., 2012.).

- **Potencijalni učinci BT-A koji nisu povezani s cijepanjem SNAP-25?**

Postoji nekoliko eksperimentalnih istraživanja na kulturama staničnih linija koje ne eksprimiraju SNAP-25, a na kojima BT-A ostvaruje različite učinke ovisno o koncentraciji (Matak i Lacković, 2015.). O farmakološkim učincima BT-A koji bi bili neovisni o SNAP-25 proteinu se nedovoljno zna, no ne mogu se u potpunosti isključiti, niti se može sagledati njihovo potencijalno kliničko značenje.

## 1.2.2 Klinička primjena BT-A

Opažanja i istraživanja BT-A započela su prvim opisom simptoma botulizma 1822. godine i već tada idejom o korištenju niskih doza toksina u terapijske svrhe, nastavila su se identifikacijom i pročišćavanjem različitih serotipova toksina početkom 20. stoljeća, prekliničkim testiranjima na primatima 1960.-tih godina te karakterizacijom genoma *C. botulinum* 1987. godine. Rezultat kliničkih opažanja i istraživanja bilo je odobravanje primjene niskih doza BT-A u liječenju strabizma, pa potom i blefarospazma od strane američke Agencije za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) 1989. godine.

Od tada do danas BT-A je najčešće korišten terapijski protein, zahvaljujući širokoj kozmetičkoj primjeni, ali i proširenju terapijske primjene s poremećaja karakteriziranih pretjeranom mišićnom kontrakcijom na hipersekrecijske poremećaje autonomnog živčanog sustava (poput primarne aksilarne hiperhidroze) te na poremećaje karakterizirane bolnom preosjetljivošću (poput migrene). Iako je odobren tek u 10-ak indikacija, široko se koristi i „*off-label*“, odnosno izvan indikacijskog područja (tablica 2).

Registrirana su 3 pripravka BT-A:

- Botox<sup>®</sup>, Botox Cosmetic<sup>®</sup> (Allergan, SAD): onabotulinumtoxin A (kao kompleks veličine 900 kDa)
- Dysport<sup>®</sup> (Ipsen, Francuska): abobotulinumtoxin A (kao kompleks veličine 900 kDa)
- Xeomin<sup>®</sup> (Merz, Njemačka): incobotulinumtoxin A (150 kDa biološki aktivni dio kompleksa)

**Tablica 2 Popis kliničkih stanja u kojima se primjenjuje BT-A**

([http://www.allergan.com/assets/pdf/botox\\_pi.pdf](http://www.allergan.com/assets/pdf/botox_pi.pdf); Jankovic, 2004.; Jabbari i Machado, 2011.; Dressler, 2013.)

ŽIVČANO-MIŠIĆNA SPOJNICA	AUTONOMNE SINAPSE	SENZORNE SINAPSE
<b>ODOBRENA PRIMJENA:</b>		
Strabizam (1989.) Blefarospazam (1989.) Hemifacijalni spazam (1990.) Cervikalna distonija (2002.) Spazam mišića gornjih (2010.) i donjih (2016.) ekstremiteta kod djece s cerebralnom paralizom i kod odraslih nakon moždanog udara Kozmetička primjena: glabelarne linije i lateralne kantalne bore (2002.)	Primarna aksilarna hiperhidroza (2010.) Urinarna inkontinencija s prekomjernom neurogenom aktivnošću <i>m. detrusora</i> (2011.) Pretjerano aktivan mokraćni mjehur (2011.)	Prevenција kronične migrene (2010.)
<b>„OFF-LABEL“ PRIMJENA I U FAZI ISPITIVANJA:</b>		
Ostale fokalne distonije: laringealna, oromandibularna, orolingualna, distonije trupa i udova, profesionalne („writer's cramp“) Spastičnost udova kod multiple skleroze i ozljeda SŽS Esencijalni tremor ruku i glave Sindrom ukočene osobe Bruksizam Poremećaji glatkih mišića: benigna hiperplazija prostate, disinergija mišića zdjelice, ahalazija, analna fisura, disfunkcija Oddijevog sfinktera, Raynoudov fenomen Kozmetička primjena: hipertrofične bore platizme	Palmarna hiperhidroza Freyjev sindrom Hipersalivacija Hiperlakrimacija Sijaloreja	Križobolja Miofascijalni bolni sindrom Piriformis sindrom Kompleksni regionalni bolni sindrom (CPRS) Tenzijska glavobolja Glavobolja kao posljedica prekomjerne primjene lijekova Lateralni epikondilitis Osteoartritis Bol u ramenima Fantomaska i rezidualna bol Neuropatska bol: trigeminalna, postherpetička i dijabetička neuropatija Visceralna bol: kronična bol zdjelice, prostate i mokraćnog mjehura (intersticijski cistitis)

Potentnost im je izražena u internacionalnim jedinicama (i.j.), kao količina toksina koja odgovara srednjoj letalnoj dozi (LD50) za miša (McClellan i sur., 1996.). No, svaki je komercijalni proizvod BT-A specifičan s obzirom na razlike u proizvodnom procesu tijekom kojeg se može smanjiti aktivnost aktivnog dijela toksina, zbog čega se međusobno ne mogu uspoređivati. Tako je u kliničkim studijama utvrđeno da jednoj jedinici Botox<sup>®</sup>-a odgovara jedna jedinica Xeomin<sup>®</sup>-a, a tri jedinice Dysport<sup>®</sup>-a (Scaglione, 2016.).

Osim BT-A, u terapijske se svrhe koristi još samo BT-B (rimabotulinumtoxin B, Myoblock<sup>®</sup>), no u fazi istraživanja su i rekombinantni proteini sa selektivnim djelovanjem na nocicepcijske neurone ili kojima je cilj poboljšati farmakodinamička i farmakokinetička

svojstva pojedinih serotipova (Masuyer i sur., 2014.). Primjerice, BT-E učinak ostvaruje brže, ali on traje kraće u odnosu na učinak BT-A, pa je stvaranjem kimeričnog proteina BT-E/BT-A moguće postići brže i dugotrajno djelovanje (Dolly, 2011.). Također se malim izmjenama u strukturi toksina pokušavaju izbjeći nuspojave vezane uz moguće širenje toksina s mjesta primjene (Scaglione, 2016.), a istraživanjem transdermalnih oblika koji omogućuju apsorpciju velike proteinske molekule kroz kožu pokušava se omogućiti neinvazivan put primjene (Carmichael i sur., 2010.).

### **1.2.3 Antinociceptivno djelovanje BT-A**

Povoljno djelovanje BT-A na bol najprije je uočeno u bolesnika s cervikalnom distonijom (Tsui i sur., 1986.), a smatralo se posljedicom smanjene mišićne kontrakcije. Međutim, daljnjim kliničkim opažanjima uočeno je da analgetsko djelovanje nastupa prije i da traje dulje od miorelaksirajućeg djelovanja (Freund i Schwartz, 2003.), te da BT-A može smanjiti bol koja nije praćena povećanom mišićnom kontrakcijom, poput tenzijske glavobolje i neuropatske boli (Silberstein i sur., 2000.; Argoff, 2002.), što je konačno dovelo do zaključka da je učinak BT-A na bol neovisan o učinku na mišiće te da je vjerojatno posljedica izravnog djelovanja BT-A na senzorne neurone.

#### **1.2.3.1 Kliničke studije**

Smanjenje boli nakon jednokratne intramuskularne i/ili intradermalne lokalne primjene malih doza BT-A (ukupno 7.5–10 ng; 0.24 ng na jedno mjesto injiciranja intramuskularno, a 1.45–3 ng intradermalno) je dugotrajno (čak do 6 mjeseci) (Jabbari i Machado, 2011.). Smatra se da je to posljedica dugotrajnog zadržavanja proteolitički aktivnog lakog lanca BT-A u citoplazmi i otpornosti na proteosomalnu razgradnju (Tsai i sur., 2010.). Dugotrajnost djelovanja daje BT-A očitu prednost pred klasičnim analgeticima, koji se moraju uzimati redovito i svakodnevno. Osim toga, kod primjene BT-A nisu uočene nuspojave, ne razvija se tolerancija i nema potencijal zlouporabe. Analgetik takvih jedinstvenih svojstava bi za farmakoterapiju boli, posebno onu kroničnog trajanja, mogao biti od posebne važnosti. Od bolnih je poremećaja BT-A odobren samo za prevenciju kronične migrene (glavobolja prisutna  $\geq 15$  dana mjesečno, u trajanju  $\geq 4$  sata dnevno) na osnovu rezultata velike multicentrične PREEMPT (prema engl.: *Phase 3 REsearch Evaluating Migraine Prophylaxis Therapy*) studije (Dodick i sur., 2010.).

**Tablica 3 Sustavni pregledni članci i meta-analize o učinkovitosti primjene BT-A u liječenju bolnih poremećaja (Matak i Lacković, 2014.)**

<b>Bolni poremećaj</b>	<b>Broj studija</b>	<b>Ukupan broj pacijenata</b>	<b>Zaključci</b>	<b>Referenca</b>
<b>Miofascijalni bolni sindrom</b>	4	233	Neuvjerljivi dokazi o učinkovitosti	Soares i sur., 2012.
<b>Subakutna/kronična bol u vratu</b>	9	503	Nedovoljna učinkovitost	Langevin i sur., 2011.
<b>Križobolja</b>	3	123	Učinkovitost uz dokaze loše kvalitete	Waseem i sur., 2010.
<b>Bol u ramenima zbog spastične hemiplegije ili artritisa</b>	6	164	BT-A smanjuje bol i popravlja funkciju ramena	Singh i Fitzgerald, 2010.
<b>Postoperativna bol nakon subpektoralne implantacije</b>	7	427	Učinkovitost uz dokaze loše kvalitete	Winocour i sur., 2014.
<b>Trigeminalna neuralgija</b>	6	101	Moguća učinkovitost	Hu i sur., 2013.
<b>Tenzijska glavobolja</b>	7	675	Broj glavobolja nije manji u odnosu na placebo	Jackson i sur., 2012.
<b>Epizodična migrena</b>	9	1838	Broj glavobolja nije manji u odnosu na placebo	Jackson i sur., 2012.
<b>Kronična migrena</b>	5	1508	Broj glavobolja značajno manji u odnosu na placebo	Jackson i sur., 2012.
<b>Kronična dnevna glavobolja</b>	3	1115	Broj glavobolja značajno manji u odnosu na placebo	Jackson i sur., 2012.

Iako je učinak BT-A ispitivan u različitim bolnim stanjima, većinom se radi o opažanjima na malom broju pacijenata. Za neka bolna stanja postoje randomizirane, dvostruko-slijepo, placebo kontrolirane studije (RCT) (Jabbari i Machado, 2011.), no rezultati su često kontradiktorni. Štoviše, i rezultati meta-analiza i sustavnih preglednih članaka nisu dovoljno uvjerljivi, osim za kroničnu migrenu i kroničnu dnevnu glavobolju (Tablica 3). Uz mali broj pacijenata te mali broj RCT-a, kao razlozi kontradiktornih ili negativnih rezultata navode se i: nedostatak standardiziranih smjernica za primjenu i doziranje BT-A, razlike u metodologiji procjene boli u pacijenata te razlike u definiranju primarnih ishoda studije (Jabbari i Machado, 2011.).

### **1.2.3.2 Eksperimentalni modeli boli u ljudi**

Ispitivanja antinociceptivnog djelovanja BT-A na eksperimentalnim modelima boli dizajnirana su kao dvostruko-slijepo, placebo kontrolirane studije, u kojima je BT-A injiciran intradermalno, supkutano ili intramuskularno u područje podlaktice, bedra ili frontalni dio glave zdravim dobrovoljcima. Eksperimentalna bol uzrokovana je primjenom

glutamata (da Silva i sur., 2014.), električnom stimulacijom (Blersch, 2002.; Krämer, 2003.), UV-B zračenjem (Syha i sur., 2006.) te, u najvećem broju studija, kapsaicinom (Voller i sur., 2003.; Gazerani i sur., 2006.; Schulte-Mattler i sur., 2007.; Tugnoli i sur., 2007.; Gazerani i sur., 2009.; da Silva i sur., 2014.). Općeniti zaključci ovih studija upućuju da BT-A vjerojatno nema utjecaja na akutnu i nocicepcijsku bol, poput osjetljivosti na mehanički, termalni i električni podražaj (Blersch i sur., 2002.; Gazerani i sur., 2009.) te akutnu bol uzrokovanu UV-B zračenjem (Syha i sur., 2006.), no u nekim studijama smanjuje bol i neurogenu upalu te periferno lučenje glutamata nakon injiciranja kapsaicina (da Silva i sur., 2014.). Moguće učinke na nocicepcijsku bol i neurogenu upalu uzrokovanu kapsaicinom moguće je objasniti pretkliničkim nalazima o selektivnosti djelovanja BT-A na neurone koji ekspresiraju TRPV1 receptor, odnosno na kapsacin-osjetljive neurone (Matak i sur., 2014.). U većini je protokola učinak BT-A na smanjenje boli uočen tek 3. dan od pred-tretmana.

### ***1.2.3.3 Pretklinička ispitivanja antinociceptivnog djelovanja BT-A***

Istraživanja antinociceptivnog djelovanja BT-A na eksperimentalnim modelima boli slijedila su nakon kliničkih opažanja o mogućem djelovanju BT-A na bol. Do danas je antinociceptivno djelovanje BT-A istraživano u eksperimentalnim modelima različitih vrsta boli (tablica 4): **somatske površinske i duboke upalne** (Cui i sur., 2004.; Bach-Rojecky i Lacković, 2005.; Luvisetto i sur., 2006.; Favre-Gulimard i sur., 2009.; Matak i sur., 2011.; Filipović i sur., 2012.; Shimizu i sur., 2012.; Vacca i sur., 2012.; Shin i sur., 2013.; Yoo i sur., 2014.; Luvisetto i sur., 2015., Lacković i sur., 2016.), **neuropatske i polineuropatske** (Bach-Rojecky i sur., 2005.; Park i sur., 2006.; Luvisetto i sur., 2007.; Favre-Guilmarde i sur., 2009.; Kitamura i sur., 2009.; Bach-Rojecky i sur., 2010.; Mika i sur., 2011.; Xiao i sur., 2011.; Filipović i sur., 2012.; Kumada i sur., 2012.; Vacca i sur., 2013.; Xiao i sur., 2013.), **visceralne** (Chuang i sur., 2004., 2008., 2009.; Coelho i sur., 2014.) te na specifičnom modelu **kronične bilateralne mišićne hiperalgezije** (Bach-Rojecky i Lacković, 2009.) i **postoperativne boli** (Filipović i sur., 2010.).

Na ovim je različitim modelima akutne i kronične boli okarakterizirano antinociceptivno djelovanje BT-A te su pokazane posebnosti koje su usmjerile daljnja istraživanja:

A) **Izostanak djelovanja na akutne bolne podražaje: kemijske (1.faza formalinskog testa), termalne (test vruće ploče) i mehaničke (test pritiska šape)** (Bach-Rojecky, Doktorski rad 2006.; Cui i sur., 2004.), što čini ga čini različitim u odnosu na konvencionalne analgetike poput opioidnih agonista i lokalnih anestetika (Tjølsen i sur., 1992.).



**B) Smanjenje patološke bolne preosjetljivosti (spontane boli, hiperalgezije i alodinije)** različitih uzroka (upalnu i neuropatsku), koja nastaje kao posljedica središnje senzitivacije.

**C) Antinociceptivno djelovanje BT-A ostvaruje u nižoj dozi nego neuroparalitičko djelovanje, ali ono nastupa s odgodom 3–5 dana nakon periferne primjene.** Ispitane učinkovite doze BT-A u štakora iznosile su 3.5, 5, 7, 15 i.j./kg i 30 i.j./kg. Najmanja učinkovita antinociceptivna doza BT-A za štakora iznosi **3.5 i.j./kg** nakon periferne primjene supkutano u područje plantarne površine stražnje šape (i.pl.) (Bach-Rojecky i sur., 2005.), dok doza od **30 i.j./kg** i.pl. BT-A uzrokuje promjene motoričkih funkcija zbog izazivanja mišićne relaksacije (mjereno rota-rod testom) (Cui i sur., 2004.).

**D) Brže djelovanje u nižim dozama nakon primjene u spinalni kanal (intratekalno, i.t.) u odnosu na perifernu primjenu.** BT-A nakon primjene u spinalni kanal u dozi 7 puta nižoj od najniže učinkovite doze kod periferne primjene ostvaruje antinociceptivno djelovanje unutar 24 h u različitim modelima boli (Bach-Rojecky, 2006., Doktorski rad).

**E) Disocijacija protuupalnog i antinociceptivnog djelovanja.** U dozama u kojima BT-A smanjuje bolnu preosjetljivost (5 i 10 i.j./kg) uzrokovanu karagenanom i kapsaicinom, nema učinak na periferne upalne karakteristike pojedinog modela, odnosno veličinu edema šape uzrokovanog karagenanom ili ekstravazaciju proteina plazme uzrokovane kapsaicinom (Bach-Rojecky i sur., 2008.; Favre-Guilmond i sur., 2009.).

**F) Smanjenje bolne preosjetljivosti izvan mjesta uzrokovanja boli** (Bach-Rojecky i Lacković, 2009.; Lacković i sur., 2016.). BT-A primijenjen periferno smanjuje hiperalgezu i alodiju u modelima bilateralne boli (na kontralateralnoj strani) i u modelu dijabetičke polineuropatije.

Neke od ovih karakteristika antinociceptivnog djelovanja BT-A proizašle iz bihevioralnih pokusa dovela su u pitanje održivost dotadašnje teorije o mehanizmu kojim BT-A ostvaruje antinociceptivni učinak, a koji je pretpostavljao inhibiciju lučenja neurotransmitora i periferne senzitivacije na mjestu primjene BT-A. Daljnim istraživanjima, koja su opisana u sljedećem odlomku, dan je novi uvid u mjesto i mehanizam djelovanja BT-A na bol.

**Tablica 4 Animalni eksperimentalni modeli boli u kojima BT-A smanjuje spontanu bol ili preosjetljivost na bolne podražaje**

Vrsta boli	Eksperimentalni modeli	Referenca
<b>PODRUČJE INERVACIJE N. ISCHIADICUSA</b>		
<b>UPALNA BOL</b>		
- Površinska	Formalinski test (šapa) Injiciranje kapsaicina u šapu Injiciranje karagenana u šapu Injiciranje alilizotiocijanata u šapu	Cui i sur., 2004.; Luvisetto i sur., 2006., 2015., Vacca i sur., 2012.; Bach-Rojecky i Lacković, 2005.; Favre- Gulimard i sur., 2009.; Shin i sur., 2013. Yoo i sur., 2014.
- Duboka	Injiciranje CFA u koljeni zglob	
<b>NEUROPATSKA BOL</b>		
- Mononeuropatije	Parcijalno presijecanje <i>n. ischiadica</i> Konstrikcijska ozljeda <i>n. ischiadica</i> (CCI) Podvezivanje spinalnog živca Presijecanje ventralnih korjenova	Bach-Rojecky i sur., 2005.; Luvisetto i sur., 2007.; Mika i sur., 2011.; Vacca i sur., 2013.; Park i sur., 2006.; Xiao i sur., 2011., 2013.
- Polineuropatije	Dijabetička polineuropatija uzrokovana streptozotocinom Polineuropatija uzrokovana paklitakselom	Bach-Rojecky i sur., 2010.; Favre-Guilmand i sur., 2009.
<b>OSTALO</b>		
	Postoperativna bol uzrokovana zarezivanjem <i>m. gastrocnemiusa</i> Kronična bilateralna mišićna hiperalgezija uzrokovana dvostrukim injiciranjem kisele fiziološke otopine u <i>m. gastrocnemius</i>	Filipović i sur., 2010.  Bach-Rojecky i Lacković, 2009.
<b>PODRUČJE INERVACIJE N. TRIGEMINUSA</b>		
<b>UPALNA BOL</b>		
- Površinska	Orofacijalni formalinski test Injiciranje kapsaicina s.c. u područje brkova	Matak i sur., 2011.; Filipović i sur., 2012.; Shimizu i sur., 2012.
- Duboka	Injiciranje CFA u temporomandibularni zglob	Lacković i sur., 2016.
<b>NEUROPATSKA BOL</b>		
	Podvezivanje infraorbitalnog živca Podvezivanje velikog okcipitalnog živca	Kitamura i sur., 2009.; Filipović i sur., 2012.; Kumada i sur. 2012.
<b>PODRUČJE INERVACIJE UNUTARNJIH ORGANA</b>		
<b>UPALNA BOL</b>		
- Visceralna	Prostatitis uzrokovan kapsaicinom Cistitis uzrokovan ciklofosamidom Cistitis uzrokovan octenom kiselinom	Chuang i sur., 2004., 2008., 2009.; Coelho i sur., 2014.

### 1.3 ISTRAŽIVANJA MEHANIZMA ANTINOCICEPTIVNOG UČINKA BT-A

Kako je prethodno navedeno, *in vitro* pokusi su pokazali da BT-A cijepanjem SNAP-25 proteina može **inhibirati lučenje neurotransmitora, pa tako i onih koji su uključeni u proces nocicepcije**. U tablicama 5 i 6 navedeni su do sada opisani učinci BT-A na lučenje neurotransmitora i ekspresiju pojedinih receptora i proteina u *in vitro* i *in vivo* uvjetima.

**Tablica 5** Učinci BT-A na lučenje neurotransmitora/ekspresiju receptora uključenih u nocicepciju *in vitro* i *in vivo*

Tkivo/stanična kultura	Depolarizacija	Inhibicijski učinak BT-A	Referenca
Sfinkter šarenice kunića (trigeminalna aferentna vlakna)	Električna stimulacija	SP	Ishikawa i sur., 2000.
Mokraćni mjehur štakora tretiranog ciklofosamidom	HCl	SP i CGRP	Rapp i sur., 2006.; Lucioni i sur., 2008.
	Hiperosmotska stimulacija	ATP	Smith i sur., 2005.
Stanična kultura DRG	K <sup>+</sup> ili kapsaicin	SP	Purkiss i sur., 2000.; Welch i sur., 2000.
		Umetanje TRPV1 u membranu	Morenilla-Palao i sur., 2004
Senzorni neuroni iz TG	K <sup>+</sup> bradikinin ili kapsaicin	CGRP	Durham i Cady, 2004.; Meng i sur, 2007.
		Umetanje TRPV1 u membranu	Shimizu i sur., 2012.
Satelitne stanice iz TG	Ionicin (Ca <sup>2+</sup> )	Glutamat	da Silva i sur., 2015.

Mehanizam djelovanja BT-A na bol dugo se vremena objašnjavao analogijom s njegovim djelovanjem na mišićno-živčanoj spojnici i u autonomnim sinapsama. Prema ovoj „perifernoj hipotezi“, BT-A nakon lokalnog injiciranja djeluje isključivo na perifernim završecima primarnih aferentnih neurona blokirajući lučenje neurotransmitora i neuropeptida (Cui i sur., 2004.; Aoki, 2005.) i/ili utječe na prisutnost nekih ionskih kanala/receptora na membranama (Aoki i Francis, 2011.). Pritom se smanjuje periferna senzitivizacija i posredno središnja senzitivizacija. U prilog ovoj teoriji, Cui i sur. (2004.) su među prvima pokazali da BT-A u eksperimentalnoj upalnoj boli nakon lokalnog injiciranja smanjuje lučenje glutamata u tkivu šape štakora. S obzirom da glutamat sudjeluje u senzitivizaciji nociceptora, predloženo je da inhibicija perifernog lučenja glutamata smanjuje upalu i perifernu senzitivizaciju te time posredno inhibira i nastanak središnje senzitivizacije (Aoki i Francis, 2011.). Smanjenje

koncentracije glutamata u uzrocima dobivenima dermalnom mikrodijalizom pokazano je i kod injiciranja BT-A u kraniofacijalne mišiće u štakora, koji je pritom smanjio i glutatomom uzrokovanu mehaničku osjetljivost nociceptora (Gazerani i sur., 2010.). Perifernim mjestom djelovanja pokušao se objasniti i učinak toksina na visceralnu bol mokraćnog mjehura, s obzirom da je u biopsijama mjehura pacijenata s pretjerano aktivnim mokraćnim mjehurom liječenih s BT-A uočena smanjena ekspresija TRPV1 i P2X3 receptora (Apostolidis i sur., 2005.).

**Tablica 6 Periferni i središnji učinci BT-A u *in vivo* eksperimentalnim modelima.** Istaknuti su središnji učinci nakon periferne ili središnje (intratekalne) primjene. Ispitivanja u kojima je korišten Botox® su bez oznake; \* nekomercijalni 150 kDa toksin (prof. Montecucco, Sveučilište u Padovi); + „kineski botulinum toksin“, kao 900 kDa kompleks (Lanzhou Institute for Biological Products, Kina); # Dypport®; †900 kDa kompleks (Wako, Japan). Kratice: CCI–neuropatija uzrokovana konstriktivskom ozljedom n. ischiadicusa; CaMK-II–o kalciju i kalmodulinu ovisna protein kinaza tipa 2; PDYN – prodinorfin; PNOc - pronociceptin, NOS1–NO sintetaza 1; C1q–komponenta komplementa 1q; *p* ispred kratice-fosforilirani oblik

<b>Eksperimentalni model boli; životinjska vrsta</b>	<b>Način primjene i doza BT-A</b>	<b>Učinak BT-A</b>	<b>Referenca</b>
Formalinski test; štakor	i.pl. 7 i.j./kg	Smanjen porast glutamata u tkivu šape <b>Smanjena ekspresija c-Fos u kralješničnoj moždini</b>	Cui i sur., 2004. Aoki, 2005.
Cistitis uzrokovan HCl-om; štakor	u mokraćni mjehur 25 i.j./1 mL	Smanjena ekspresija CGRP-a u tkivu mjehura	Chuang i sur., 2004.
Prostatitis; štakor	u tkivo prostate 20 i.j./1 mL	<b>Smanjena ekspresija COX-2 u tkivu prostate i kralješničnoj moždini</b>	Chuang i sur., 2008.
Cistitis uzrokovan ciklofosamidom; štakor	u mokraćni mjehur 20 i.j./ 1 mL i.t. 5 i.j./ 50 µL	<b>Smanjena ekspresija COX-2 i EP4 u tkivu mjehura i kralješničnoj moždini</b> <b>Smanjena ekspresija c-Fos, pERK, CGRP u kralješničnoj moždini</b>	Chuang i sur., 2009. Coelho i sur., 2014.
Formalinski test; miš	i.t. 0.01 i.j./ 5 µL	<b>Smanjena ekspresija CGRP, pERK i pCaMK-II u kralješničnoj moždini</b>	Lee i sur., 2011.
CCI; štakor	* i.pl. 75 pg	<b>Smanjena ekspresija C1q i SNAP-25 mRNA u kralješničnoj moždini i DRG;</b> smanjena ekspresija PDYN, PNOc, NOS1 i C1q mRNA u DRG	Mika i sur., 2011.
CCI; miš	* i.pl. 15 pg	<b>Smanjena ekspresija GFAP i CD11b u kralješničnoj moždini</b>	Vacca i sur., 2013.
Presijecanje ventralnih korjenova; štakor	+ i.pl. 10 i 20 i.j./kg	Smanjena ekspresija P2X3 i TRPV1 receptora u DRG	Xiao i sur., 2011., 2013.
Artritis uzrokovan CFA, štakor	# i.a. 20 i.j./100 µL	Smanjena ekspresija IBA1 i IL-1β u tkivu zgloba	Yoo i sur., 2014.
/	† s.c. u područje njuške 5 i.j./20 µL	Smanjena ekspresija TRPV1 u TG i trigeminalnim završecima	Shmizu i sur. 2012.

Međutim, teorijom o isključivo perifernom mjestu djelovanja nije moguće objasniti sljedeće nalaze:

- a) udaljene učinke BT-A nakon periferne primjene, poput bilateralnog antinociceptivnog učinka nakon unilateralne primjene u različitim modelima bilateralne boli (Bach-Rojecky i Lacković, 2009.; Favre-Guilmard i sur., 2009.; Bach-Rojecky i sur., 2010.; Filipović i sur., 2012.; Lacković i sur., 2016.), te smanjenje neurogene upale dure (Lacković i sur., 2016.)
- b) izostanak antinociceptivnog djelovanja BT-A te učinka na neurogenu ekstravazaciju proteina plazme u tvrdoj moždanoj ovojnici (*dura mater*) u uvjetima inhibicije aksonalnog transporta intraneuronalnom ili intraganglijskom primjenom kolhicina (Bach-Rojecky i Lacković, 2009.; Matak i sur., 2011.; Filipović i sur., 2012.),
- d) brži početak djelovanja i učinkovitost nižih doza BT-A nakon intraneuronalne ili središnje (i.t.) primjene (Bach-Rojecky i sur., 2010.), te konačno
- e) kliničku učinkovitost u bolnim poremećajima poput migrene, koja je definirana kao bolest središnjeg živčanog sustava (Jackson i sur., 2012.).

Temeljem ovih nalaza postavljena je hipoteza o središnjem mjestu antinociceptivnog djelovanja BT-A, te je pretpostavljeno da BT-A s mjesta primjene u SŽS dolazi mikrotubulima posredovanim aksonalnim transportom (Bach-Rojecky i Lacković, 2009.). S obzirom da eksperimentalno korištene niske doze BT-A nakon lokalne primjene u mišić ili pod kožu ne uzrokuju sistemske neželjene učinke, isključena je mogućnost sistemske apsorpcije i dolaska BT-A u središnje strukture putem krvi. Uzevši u obzir prethodno opisane eksperimentalne nalaze retrogradni aksonalni transport čini se najvjerojatnijim načinom dolaska BT-A u SŽS. Važan korak u daljnjim istraživanjima bio je dokazati prisutnost enzimski aktivnog lakog lanca BT-A u senzornim područjima SŽS-a nakon periferne primjene.

### **1.3.1 Retrogradni aksonalni transport BT-A u SŽS nakon periferne primjene**

Aksonalni transport BT-A nakon i.m. primjene pokazan je ranim studijama, obilježavanjem toksina radioaktivnim jodom ( $^{125}\text{I}$ ), gdje je radioaktivnost detektirana u ipsilateralnom dorzalnom rogu nakon 48 h (Habermann, 1974.; Wiegand i sur., 1976.; Wiegand i Wellhoner, 1977.). Značenje ovih pokusa dovedeno je u pitanje s obzirom da nije pokazano je li toksin u SŽS-u enzimski aktivan, odnosno postojala je mogućnost da se tijekom sporog prolaska kroz akson mogao inaktivirati (Black i Dolly, 1986.). Također, radioaktivnost je primijećena i na

udaljenim mjestima poput štitnjače, pa je postojala sumnja u specifičnost signala, odnosno mogućnost da je ona posljedica disociranog  $^{125}\text{I}$  s kompleksa (Tang-Liu i sur., 2003.).

Kako bi se riješile ove nedoumice, dizajnirano je protutijelo specifično na pocijepani fragment SNAP-25 proteina (clSNAP-25), koji nastaje kao produkt enzimske aktivnosti BT-A (Matak i sur., 2011.). Kako jedna molekula BT-A može cijepati veliki broj SNAP-25 molekula, ovaj način detekcije BT-A ima i veću osjetljivost (Matak i Lacković, 2014.). U prvim su pokusima Caleo i sur. pronašli clSNAP-25 u facijalnoj motornoj jezgri 3 dana nakon periferne primjene BT-A u područje njuške štakora (Antonucci i sur., 2008.), pa potom i u optičkom tektumu nakon primjene u oko (Restani i sur., 2011.). Matak i sur. prvi su pronašli imunoreaktivnost clSNAP-25 u senzornim područjima SŽS-a: u dorzalnom rogu kralješnične moždine nakon primjene BT-A u *m. gastrocnemius* ili supkutano u stražnju šapu štakora (i.pl.), odnosno u TNC-u nakon s.c. primjene u područje njuške (Matak i sur., 2011., 2012.). Osim toga, u miševa je clSNAP-25 nađen u cijelom nocicepcijskom putu: u tkivu stražnje šape, *n. ischiadicusu*, DRG-u i dorzalnom rogu kralješnične moždine nakon i.pl. primjene (Marinelli i sur., 2012.).

Da su prisutnost clSNAP-25 u senzornim dijelovima SŽS-a i antinociceptivno djelovanje BT-A međusobno povezani, pokazano je u nekoliko eksperimenata (Matak i sur. 2011., 2012.):

- ispitivanjem detekcije clSNAP-25 **ovisno o dozi** primijenjenog BT-A: clSNAP-25 pokazan je u TNC-u nakon injiciranja najniže učinkovite doze BT-A (3.5 i.j./kg; s.c. u područje njuške štakora) u bihevioralnim istraživanjima;
- ispitivanjem detekcije clSNAP-25 **ovisno o vremenu** nakon perifernog injiciranja BT-A: imunoreaktivnost clSNAP-25 primijećena je tek nakon 3 dana, što se podudara s nastupom antinociceptivnog učinka (nakon 24 h clSNAP-25 nije primijećen u SŽS-u);
- ispitivanjem detekcije cl-SNAP-25 nakon **blokade aksonalnog transporta** BT-A: sukladno rezultatima u bihevioralnim pokusima, intraganglijska primjena kolhicina spriječila je proteolitičku aktivnost BT-A, odnosno detekciju clSNAP-25.

Premda je uočena imunoreaktivnost posljedica transporta enzimski aktivnoga lakog lanca BT-A, a ne transporta clSNAP-25 s periferije (Antonucci i sur., 2008.), postavljeno je pitanje specifičnosti korištenog protutijela te su u literaturi kritizirane visoke doze BT-A korištene u spomenutim istraživanjima (Aoki i Francis, 2011.). Međutim, istraživanjima u našem laboratoriju pokazana je specifičnost protutijela na clSNAP-25 u odnosu na intaktni SNAP-25 Western blot metodom (Matak i sur., 2011.) te proteolitička aktivnost niskih doza (3.5 i 5 i.j./kg) komercijalnog pripravka BT-A (Botox<sup>®</sup>), koje su usporedive s dozama koje se koriste

klinički (Intiso, 2012.). Ovim su pokusima pobijene kritike vezane uz nespecifičnost korištenog imunokemijskog pristupa detekcije proteolitičke aktivnosti BT-A.

### **1.3.2 Selektivnost djelovanja BT-A na bolnu preosjetljivost**

Dosad izloženi rezultati neupitno potvrđuju središnje mjesto djelovanja BT-A na „bolnu“ neurotransmisiju, mehanizmom koji najvjerojatnije uključuje inhibiciju o SNARE ovisne egzocitoze nocicepcijskih neurotransmitora. Međutim, središnji mehanizam kojim BT-A utječe na nocicepciju nije poznat. Logična je pretpostavka da BT-A inhibira lučenje ekscitacijskih neurotransmitora (poput glutamata, SP, CGRP i dr.) iz središnjih završetaka primarnih aferentnih neurona. Međutim, u modulaciju nocicepcije na spinalnoj razini uključene su različite strukture (glija stanice, interneuroni) i različiti neurotransmitori/neuropeptidi/neuromodulatori koji izravno ili neizravno moduliraju egzocitozu iz primarnog aferentnog neurona i utječu na prijenos bolnog signala u više strukture SŽS-a (supraspinalno).

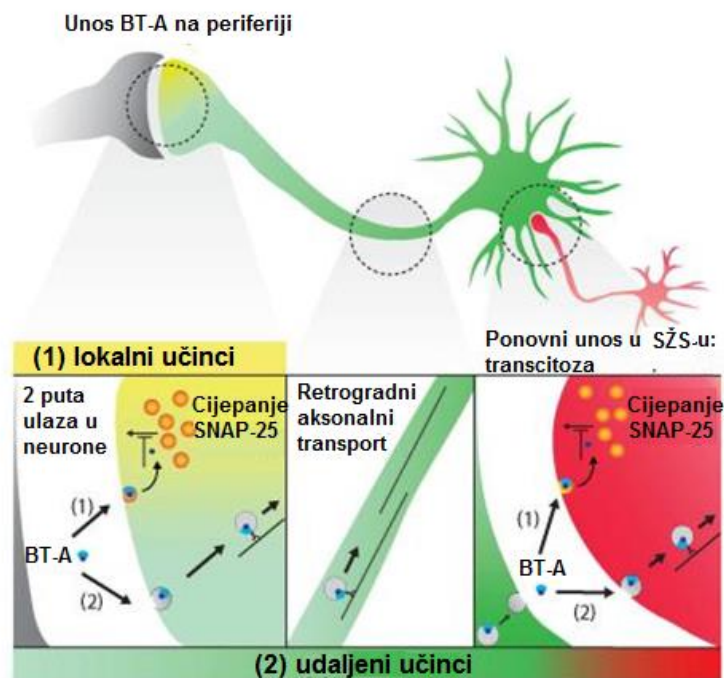
Kao što je više puta naglašeno, prema pretkliničkim i kliničkim istraživanjima posebnost djelovanja BT-A na bol je da dugotrajno i selektivno smanjuje patološku bol, nastalu kao rezultat plastičnih promjena i središnje senzitivacije te patoloških promjena u dorzalnog rogu kralješnične moždine, bez utjecaja na normalan prag osjetljivosti (Cui i sur., 2004.; Sycha i sur., 2006.; Burstein i sur., 2014.). Time se razlikuje od ostalih konvencionalnih analgetika. Ovakve posebnosti teško je objasniti trenutnim saznanjima o mehanizmu djelovanju BT-A. Stoga se otvaraju nova pitanja i mogućnosti, primjerice o selektivnom djelovanju BT-A na određene vrste stanica SŽS-a i/ili interferenciji s određenim središnjim neurotransmitorskim sustavima. U potrazi za odgovorima, dva su ključna pitanja:

#### **I. Putuje li BT-A u SŽS određenim podtipom nocicepcijskih vlakana?**

Nedavno je pokazano u području trigeminalne inervacije da se učinak BT-A, kao i pojava c1SNAP-25 u TNC-u i *duri mater*, može u potpunosti spriječiti selektivnim uništenjem C vlakana koja eksprimiraju TRPV1 receptor (tzv. kapsaicin-osjetljiva vlakna) (Matak i sur., 2014.). Ovaj važan nalaz upućuje na uključenost specifičnog podtipa vlakana u aksonalni transport i antinociceptivno djelovanje BT-A, barem u području glave te bi ga vrijedilo dodatno ispitati. Naime, uključenost C polimodalnih neurona u aksonalni transport i antinociceptivno djelovanje BT-A mogla bi objasniti neučinkovitost BT-A na akutnu bol koja je prvenstveno posredovana aktivnošću A $\delta$  nocicepcijskih vlakana.

## II. Do kuda BT-A putuje, odnosno može li BT-A „preskočiti“ s jednog neurona u druge neurone ili glija stanice?

Uz retrogradni aksonalni transport, drugi potencijalno važan udaljeni učinak BT-A je transsinaptički prijenos (transcitoza) u neurone „uzvodno“ od neurona kojima je posredovan inicijalni korak endocitoze (Bomba-Warczak i sur., 2016., slika 6). Na staničnoj kulturi hipokampalnih neurona i motoneurona pokazano je da bi udaljeni učinci BT-A mogli biti posredovani drugačijim mehanizmom endocitoze u početni neuron u odnosu na endocitozu posredovanu SV2 mjehurićima, a koji izbjegava zakiseljavanje sinaptičkih mjehurića (Bomba-Warczak i sur., 2016.; Restani i sur., 2012.). Time ne dolazi do odvajanja lakog i teškog lanca, te cijeli toksin u endosomu putuje na udaljena mjesta. Alternativni put endocitoze BT-A, uz retrogradni aksonalni transport i transcitozu, pokazan je u staničnoj kulturi koja ne eksprimira SV2 protein (Bomba-Warczak i sur., 2016.).



Slika 6 Shematski prikaz potencijalnih lokalnih i udaljenih učinaka BT-A (Bomba-Warczak i sur., 2016.)

Transcitoza BT-A između perifernog aferentnog neurona i neurona drugog reda do sada je *in vivo* pokazana u gornjem kolikulu (lat. *superior colliculus*) nakon primjene BT-A u oko štakora, odnosno u retini nakon primjene u optički tektum (Restani i sur., 2011.; 2012.), no nisu provedena istraživanja vezana uz senzorne neurone. Neki učinci BT-A poput:



a) smanjenja aktivacije astrocita u eksperimentalnoj neuropatskoj boli nakon i.pl. primjene u miša, uz kolokalizaciju c1SNAP-25 s markerom aktivacije astrocita GFAP (Vacca i sur., 2012.) u dorzalnog rogu kralješnične moždine, i

b) smanjenja duralne ekstravazacije nakon s.c. primjene u područje njuške štakora, uz kolokalizaciju c1SNAP-25 s neuropeptidom CGRP u *duri mater* (Lacković i sur., 2016.), sugeriraju da bi BT-A mogao putovati i djelovati dalje od prve sinapse dorzalnog roga, odnosno TNC-a, što bi moglo također biti važno u rasvjetljavanju mehanizma djelovanja BT-A na patološku bolnu preosjetljivost.

S obzirom na kompleksne mehanizme nocicepcije na spinalnoj razini, a uzevši u obzir posebnosti antinociceptivnog djelovanja BT-A, pretpostavljamo da je mehanizam djelovanja BT-A mnogo složeniji od predložene inhibicije lučenja neurotransmitora iz središnjeg završetka primarnog neurona. Njegovo razjašnjavanje moglo bi usmjeriti primjenu BT-A u kliničkoj praksi te moguće dodatno razjasniti još uvijek nedovoljno jasne mehanizme središnje senzitivacije.

## **2 CILJ I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA**

Nasuprot uvriježenoj hipotezi o inhibiciji lučenja neurotransmitora na perifernim završecima senzornih neurona brojna novija istraživanja pokazuju da je antinociceptivno djelovanje BT-A na upalnu i neuropatsku bol središnjeg porijekla. Visceralna bol do sada praktično nije istraživana. Najmanje se, međutim, zna o mjestu i mehanizmu djelovanja BT-A u SŽS-u.

Hipoteza ovog doktorskog rada je da mehanizam središnjeg antinociceptivnog djelovanja BT-A uključuje međudjelovanje sa središnjim neurotransmitorima, koji su uključeni u procese dugotrajne potencijacije i nastanka kronične boli na spinalnoj razini.

Cilj rada je proširiti dosadašnja saznanja na oblike visceralne i bilateralne boli te bihevioralno i biokemijski ispitati uključenost glavnih (anti)nocicepcijskih neurotransmitorskih sustava (opioidni sustav, GABA-ergički sustav) u središnji antinociceptivni učinak BT-A u nekoliko vrsta eksperimentalne boli, te doprinijeti rasvjetljavanju točnijeg mjesta antinociceptivnog djelovanja u SŽS-u.

Specifični su ciljevi ovog doktorskog rada:

- ispitati učinak različitih doza opioidnih antagonista na antinociceptivni učinak BT-A u modelima akutne (upalne) i kronične (bilateralne, neuropatske) boli
- provjeriti mogućnost djelovanja BT-A na drugi inhibicijski neurotransmitorski sustav, GABA-ergički
- ispitati mjesto interakcije BT-A s opioidnim i GABA-ergičkim sustavom primjenom antagonista spinalno i supraspinalno
- ispitati mogući utjecaj BT-A te kombinacije s opioidnim antagonistima u kralješničnoj moždini na:
  - neuronalnu aktivaciju (ekspresija c-Fos proteina) u modelu akutne boli
  - aktivaciju glija stanica (ekspresija GFAP i CD11b proteina) u modelima kronične boli
- istražiti potencijalne učinke BT-A na ekspresiju  $\mu$ -opioidnih receptora, Leu/Met-enkefalina i proupalnih citokina TNF $\alpha$  i IL1 $\beta$  u modelima upalne i neuropatske boli
- utvrditi postoji li središnje porijeklo antinociceptivnog djelovanja BT-A kod abdominalne boli
- odrediti potencijalno mjesto središnjeg djelovanja BT-A injiciranjem toksina periferno, spinalno ili supraspinalno
- ispitati prisutnost toksina nakon primjene u *cisternu magnu* i moždane komore u tkivu mozga i produžene moždine

# **3 MATERI JALI I METODE**

### 3.1 Životinje

U istraživanju su korišteni mužjaci štakora soja Wistar (5–6 životinja po eksperimentalnoj skupini), stari 3–4 mjeseca i uzgajani u animalnoj jedinici Zavoda za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Rad na životinjama provodio se u skladu s Direktivom za rad na laboratorijskim životinjama Europske Unije (Direktiva 2010/63/EU) te hrvatskim Zakonom o zaštiti životinja (NN 135/06), Zakonom o dobrobiti životinja (NN) i Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe, kao i etičkim smjernicama za istraživanje eksperimentalne boli na svjesnim životinjama (IASP smjernice; Zimmermann, 1983.). Postupci na životinjama opisani su prema ARRIVE (*prema engl.: Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) smjernicama (Kilkenny i sur., 2012.). U pokusima se koristio minimalno potreban broj životinja. Kada je bilo potrebno (kirurgija, prije žrtvovanja, prije transkardijalne perfuzije) životinje su duboko anestetizirane kloral-hidratom (300 mg/kg i.p.), a primjena tvari u spinalni kanal ili *cisternu magnu* izvedena je pod kratkotrajnom anestezijom (dietil-eter, inhalacijski). Za obavljanje svih pokusa dobivena je dozvola Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (br. 07-76/2005-439) i Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (br. 72.3-13, HR 191/02/P) te pozitivno mišljenje Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

### 3.2 Ispitivane tvari

U svim je pokusima glavna ispitivana tvar BT-A (Botox<sup>®</sup>, Allergan, SAD). Bočica Botox<sup>®</sup>-a sadrži 100 i.j. pročišćenog liofilizata toksina tipa A *Clostridium botulinum* bakterije. 1 i.j. odgovara 0.048 ng, količini toksina koja nakon i.p. primjene uzrokuje smrt 50% miševa.

U ispitivanju mehanizma antinociceptivnog djelovanja BT-A u eksperimentalnim modelima korišteni su: neselektivni antagonist opioidnih receptora naltrekson (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), selektivni antagonist  $\mu$ -opioidnih receptora (Santa Cruz Biotechnology, CA, SAD), selektivni antagonist GABA<sub>A</sub> receptora bikukulin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD).

#### 3.2.1 Primjena ispitivanih tvari i korištene doze

Tablica 7 sadrži sažet prikaz farmakoloških postupaka korištenih u ovom doktorskom radu. Doze i volumeni pojedinih tvari odabrane su na temelju literaturnih podataka ili vlastitih

preliminarnih ispitivanja. Primjerice, korištene su doze antagonista opioidnih receptora za koje je pokazano da ne utječu na nocicepciju te doze antagonista GABA<sub>A</sub> receptora koje ne utječu na nocicepciju i ne uzrokuju konvulzije.

Za dobivanje potrebnih doza sve su tvari otopljene u odgovarajućem volumenu fiziološke otopine (f.o.), osim kapsaicina koji se otapa u fiziološkoj otopini uz dodatak 10 %-tnog etanola (96 %-tnog) i 10%-tnog Tween80 i bikukulina koji se otapa u f.o. uz dodatak nekoliko kapi 0.01 %-tne HCl. Životinje u kontrolnim skupinama pojedinog pokusa injicirane su na isti način i istim volumenom fiziološke otopine ili otapalom (u slučaju primjene kapsaicina i bikukulina).

**Tablica 7 Doze, volumeni i način primjene ispitivanih tvari u pojedinim eksperimentalnim modelima boli**  
*Kratice: i.c.–intracisternalno; i.c.v.–intracerebroventrikularno; i.col.–intrakolonarno; i.p.–intraperitonealno; i.pl.–intraplantarno; i.t.–intratekalno; s.c.–supkutano*

Supstancija	Primjena	Doza	Volumen	Model	Reference
<b>BT-A</b>	i.pl.	5 i.j./kg	20 µL	3.5.1	Bach-Rojecky i sur., 2005.; Bach-Rojecky i Lacković, 2005.; preliminarni testovi
		7 i.j./kg	20 µL	3.5.3, 3.5.4	
	i.t.	1 i.j./kg	10 µL	3.5.4	
		2 i.j./kg	10 µL	3.5.5, 3.5.6	
	i.c.	1 i.j./kg	10 µL	3.5.1., 3.5.2., 3.5.4	
		2 i.j./kg	10 µL	3.5.5	
	i.c.v.	1 i.j./kg	5 µL	3.5.1	
	i.p.	15 i.j./kg	2 mL	3.5.5	
i.col.	10 i.j./kg	1 mL	3.5.6		
<b>Naltrekson (N)</b>	s.c.	0.02 – 2 mg/kg	250 µL	3.5.1, 3.5.3	Correa i sur., 2010.
	i.t.	0.07 – 350 mg	10 µL	3.5.1	
<b>Naloksonazin (NN)</b>	i.p.	5 mg/kg	1 mL	3.5.1	de Freitas i sur., 2012.
	i.t.	1.5 µg	10 µL	3.5.4	
	i.c.v.	1.5 µg	5 µL	3.5.4	
<b>Bikukulin (B)</b>	i.p.	2 mg/kg	1 mL	3.5.1, 3.5.3	Micov i sur., 2010.; Yamamoto i Yaksh, 1993.
	i.t.	1 µg	10 µL	3.5.4	
	i.c.	1 µg	5 µL	3.5.4	

### 3.2.2 Opisi načina primjene tvari

Sistemske i periferni načini primjene ispitivanih tvari ili fiziološke otopine/otapala izvođeni su na neanesteziranim životinjama:

- Intraplantarno (i.pl.): supkutano u plantarnu površinu stražnje šape, desne ili lijeve
- Intraperitonealno (i.p.): u peritonealnu šupljinu
- Supkutano (s.c.): u potkožje abdominalnog dijela
- Intrakolonarno (i.col.): u kolon, 7 cm proksimalno od anokutane linije

Primjene u SŽS izvedene su na anesteziranim životinjama:

- a) Intratekalno (i.t.): između spinoznih nastavaka kralješaka u spinalni kanal lumbalnog L4/L5 segmenta kralješnične moždine (Mestre i sur., 1994.). Ispravnost primjene osigurana je promatranjem pojave pomaka repa životinje prilikom injiciranja.
- b) Intracisternalno (i.c.): između zatiljnog grebena (*protuberantia occipitalis*) i atlasa direktno kroz kožu i tvrdu moždanu ovojnicu (*dura mater*) u *cisternu magnu* (Nirogi i sur., 2009.). Ispravnost primjene provjerena je ekstrakcijom male količine CSF-a prilikom injiciranja.
- c) Intracerebroventrikularno (i.c.v.): u lateralne moždane komore. Mali rez (1 cm) je načinjen na gornjem dijelu glave te je izbušen (NSK Ultimate XL, Hoffman Estates, IL, USA) otvor promjera 1 mm u obje parijetalne kosti, 1.5–2 mm dijagonalno od križanja sagitalnog i koronalnog šava. Ukupna doza tvari podijeljena je u jednake volumene (po 2.5  $\mu$ L) te injicirana u obje komore, na dubinu od 4 mm (Noble i sur., 1967.).

Za primjenu malih volumena u moždane komore korištene su Hamilton šprice (MICROLITER syringe 10  $\mu$ L, Hamilton, Höchst, Njemačka), za primjenu u kolon transparentne kanile promjera 1 mm, a za ostale su načine primjene korištene inzulinske šprice s integriranim iglama promjera 27½ G i volumena 0.5 ili 1 mL (Terumo Europe NV, Leuven, Belgija).

### 3.3 Kemikalije i reagensi

Tvari korištene u izazivanju eksperimentalne boli su: formalin (Kemika, Zagreb, RH),  $\lambda$ -karagenan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), kapsaicin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), etanol (T.T.T., Zagreb, RH), Tween80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), octena kiselina (Kemika, Zagreb, RH) i aceton (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD).

Tvari korištene u anesteziji životinja su: kloral-hidrat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), ketamin (Richter Pharma AG, Wels, Austrija), ksilazin (Alfasan International BV, Woerder, Nizozemska) i dietil-eter (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD).

Za pripremu uzoraka korišteni su paraformaldehid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), sukroza (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) i tekući dušik (Messer Croatia Plin, Zaprešić, Hrvatska).

U postupcima imunohistokemije koristili smo natrijev fluorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), kozji serum (Vector, Burlingame, CA, USA) i medij za očuvanje fluorescencije Fluorogel® (Electron Microscopy

Sciences, Hatfield, PA, SAD). Korištena primarna protutijela su: poliklonsko protutijelo iz kunića na c-Fos (Santa Cruz Biotechnology, CA, SAD); poliklonsko protutijelo iz kunića na fragment SNAP-25 koji nastaje specifično kao produkt enzimske aktivnosti BT-A (dar laboratorija prof. Ornelle Rossetto, Sveučilište u Padovi, Italija); mišje monoklonsko protutijelo na Leu/Met-enkefalin (Santa Cruz Biotechnology, CA, SAD); mišje monoklonsko protutijelo na GFAP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD); monoklonsko protutijelo iz kunića na CD11b (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Pripadajuća sekundarna kozja protutijela Alexa Fluor-448 i Alexa Fluor-555 nabavljena su od Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD.

Priprema uzoraka i qRT-PCR analiza provedena je pomoću: TRIzol<sup>®</sup> reagensa (Invitrogen, Karlsruhe, Njemačka), kloroforma, glikogena, propanola, dietilpirokarbonatom (DPEC) tretirane vode (Invitrogen, Karlsruhe, Njemačka), TaqMan reagenasa za reverznu transkripciju (Applied Biosystems, Darmstadt, Njemačka), TaqMan univerzalnog „Master Mix“-a (Applied Biosystems, Darmstadt, Njemačka). Oligonukleotidne sekvence (*primeri*, početnice) za analizu genske ekspresije MOR (Rn01430371\_m1), TNF $\alpha$  (Rn99999017\_m1) i IL-1 $\beta$  (Rn00580432\_m1) te endogena kontrola 18sRNA nabavljeni su kao TaqMan Gene Expression Assays<sup>®</sup> od Applied Biosystems (Darmstadt, Njemačka).

### 3.4 Eksperimentalni modeli boli

Istraživanje mjesta djelovanja BT-A i interakcije sa središnjim neurotransmitskim sustavima izvedena su na patofiziološki različitim eksperimentalnim modelima boli (Tablica 8).

Tablica 8 Prikaz eksperimentalnih modela boli korištenih u ovom doktorskom radu

Model	Vrsta boli	Praćene karakteristike modela
<b>Formalinski test (2. faza)</b>	Akutna upalna bol	Spontana bol: trzanje i lizanje šape
<b>Orofacijalni formalinski test (2. faza)</b>	Akutna upalna bol	Spontana bol: trljanje injiciranog područja njuške
<b>Djelomično presijecanje <i>n. ischiadicusa</i></b>	Periferna neuropatska bol	Mehanička hiperalgezija Mehanička alodinija Hladna alodinija
<b>Injekcija 3% karagenana u <i>m. gastrocnemius</i></b>	Kronična upalna mišićna bol, bilateralna bol	Mehanička alodinija
<b>Injekcija 1% octene kiseline u peritoneum</b>	Visceralna bol, peritonitis	Spontana bol: abdominalni grčevi
<b>Injekcija 0.1% kapsaicina u kolon</b>	Visceralna bol, kolitis	Spontana bol: abdominalni grčevi Prenesena mehanička alodinija



U akutnim modelima boli praćeno je spontano ponašanje životinja u kratkom vremenskom periodu (do 60 min) nakon izazivanja boli. U kroničnim je modelima bolno ponašanje praćeno višekratno tijekom 3–4 tjedna, primjenom bolnog (mehanički pritisak) ili ne-bolnog podražaja (von Freyjev filament, kap acetona).

### **3.4.1 Mjerenje mehaničke hiperalgezije metodom pritiska šape**

Osjetljivost na mehanički podražaj mjerena je modificiranim aparatom izrađenim u našem laboratoriju metodom pritiska šape, koju su prvotno opisali Randall i Selitto (1957.). Stražnja šapa životinje stavljena je na podložak aparata te je s dorzalne strane vršen pritisak rastućeg intenziteta. Masa pri kojoj je životinja povukla šapu s podloška predstavljala je prag boli. Kako bi se spriječilo oštećenje tkiva, mjerenje je prekinuto kod mase od 250 grama. Svako je životinji izmjerena mehanička osjetljivost desne i lijeve stražnje šape po tri puta u intervalima od 10 minuta. Iz navedena 3 mjerenja izračunata je aritmetička sredina (Bach-Rojecky i sur., 2010.).

### **3.4.2 Mjerenje mehaničke alodinije primjenom von Freyjevih filamenata (vFF)**

U mjerenju mehaničke alodinije korišten je set vFF (Stoelting Co., Wood Dale, IL, SAD), raspona od 0.6 g do 26 g. Životinje su postavljene u plastični kavez s metalnim rešetkastim dnom 15 min prije testiranja kako bi se prilagodile eksperimentalnim uvjetima. VFF su primijenjeni prema Chaplanovoj uzlazno-silaznoj metodi (1994.) na područje središnjeg dijela plantarne površine desne, pa potom lijeve šape, kroz rešetkasto dno aparature. Svaki je filament primijenjen 3 puta i u savijenom obliku držan 4 sekunde na ispitivanoj šapi životinje (Wei i sur., 1998.). Najniži filament koji je izazvao povlaćenje ili lizanje šape zabilježen je kao prag mehaničkog podražaja.

### **3.4.3 Mjerenje hladne alodinije primjenom acetona**

Korištena je aparatura prethodno opisana u točki 3.4.2. Nakon prilagodbe životinja na uvjete mjerenja, kroz rešetkasto je dno primijenjen na područje središnjeg dijela plantarne površine desne, pa potom lijeve stražnje šape, podražaj koji hladi (kap 100% acetona) 5 puta u intervalima od 5 min (kako bi se spriječila senzitivizacija). Učestalost odgovora na aceton izražen je kao postotak učestalosti povlaćenja ili lizanja stražnje šape  $[(\text{broj povlaćenja ili lizanja šape} / \text{broj primjena acetona}) \times 100]$  (Park i sur., 2006.) te predstavlja mjeru hladne alodinije.

## **3.5 Eksperimentalni protokoli**

### **3.5.1 Formalinski test**

50  $\mu$ L 5 %-tnog formalina injicirano je s.c. u plantarnu površinu stražnje šape štakora. Broj trzaja i lizanja tretirane šape, kao pokazatelj bolnog ponašanja životinje, praćen je u vremenskom periodu od 60 min. Pritom prvih 15 min testa predstavlja nocicepcijsku bol uzrokovanu izravnom aktivacijom nociceptora formalinom (1. faza), a u sljedećem periodu od 45 min nastupa upalna bol kao posljedica oslobađanja medijatora upale te periferne i središnje senzitivacije (2. faza) (Tjølsen i sur., 1992.). Prethodno je pokazano da BT-A ne mijenja osjetljivost na akutni podražaj, pa tako nema utjecaj na prvu fazu formalinskog testa (Cui i sur., 2004.). Stoga su u ovom doktorskom radu prikazani rezultati samo druge faze formalinskog testa.

U formalinskom modelu upalne boli ispitan je i karakteriziran učinak sistemski i središnje (i.t.) primijenjenog naltreksona, naloksonazina i bikukulina na antinociceptivni učinak intraplantarno primijenjenog BT-A. Budući da je periferno primijenjenom BT-A potrebno 3–5 dana do postizanja antinociceptivnog učinka (Bach-Rojecky i sur., 2005.; Luvisetto i sur., 2006.), BT-A je primijenjen 5 dana prije uzrokovanja boli formalinom.

Na ovom smo modelu dodatno ispitali antinociceptivni učinak BT-A 3 dana nakon i.c. i i.c.v. primjene.

### **3.5.2 Orofacijalni formalinski test**

50  $\mu$ L 2.5 %-tnog formalina injicirano je s.c. u područje njuške štakora. Kao pokazatelj boli mjereno je vrijeme trljanja područja brkova injiciranog formalinom. Orofacijalni formalinski test obilježen je također dvjema fazama (kao formalinski test na stražnjoj šapi), no s kraćim trajanjem: prva faza traje 12 min, a druga faza 12.–45. min nakon injiciranja formalina (Raboisson i Dallel, 2004.). U ovom smo pokusu ispitali antinociceptivni učinak BT-A 3 dana nakon i.c. primjene.

### **3.5.3 Parcijalno presijecanje *n. ischiadicusa* (PPNI)**

Anesteziranim je životinjama djelomično zarezan desni *n. ischiadicus*, prema prethodno opisanom postupku (Bach-Rojecky i sur., 2005.), koji su prvotno razvili Lindenlaub i Sommer (2000.). U području desne natkoljenice napravljen je rez dugačak 2 cm te je odvajanjem mišića *biceps femoris* i *gluteus superficialis* načinjen prolaz promjera 1 cm do

živca. Živac je izoliran pomoću kirurške pincete, kroz njegovu je sredinu postavljena tanka kirurška igla te je pola promjera zarezano. Kako bismo u pokusu promatrali karakteristike neuropatske boli te eliminirali moguću poslije-operacijsku bol, u pokus je bila uključena skupina životinja s „lažnim zahvatom“, u kojih je živac samo izoliran, a nije zarezan. Osim toga, skupina netretiranih životinja (engl. *naïve*) praćena je tijekom cijelog vremenskog perioda pokusa. Pokus je ukupno trajao 3 tjedna. Životinjama je svaki drugi dan mjerena osjetljivost na mehanički podražaj metodom pritiska šape i primjenom vFF te osjetljivost na hladni podražaj primjenom acetona. Za životinje koje su pokazale preosjetljivost (barem 20% niže vrijednosti u odnosu na kontrolu i lažno operirane životinje) 2 tjedna nakon PPNI, smatrano je da su razvile neuropatiju te je u daljnjem tijeku pokusa ispitan utjecaj naltreksona i bikukulina na antinociceptivni učinak BT-A. Mjerenja osjetljivosti na mehaničke podražaje i aceton provedena su 5 dana nakon primjene BT-A, odnosno 40 min nakon primjene naltreksona ili bikukulina.

Na ovom smo modelu dodatno ispitali i antinociceptivni učinak BT-A primijenjenog u tri rane vremenske točke: 5 dana prije PPNI, 1 dan nakon PPNI i 7 dana nakon PPNI. Praćena je osjetljivost na mehanički podražaj primjenom vFF te na hladni podražaj primjenom acetona. Šesti dan nakon primjene BT-A životinje su žrtvovane radi analize utjecaja BT-A na ekspresiju proupalnih citokina TNF $\alpha$  i IL-1 $\beta$ .

#### **3.5.4 Karagenanom uzrokovana sekundarna alodinija i bilateralna bol**

100  $\mu$ L 3%-tne otopine  $\lambda$ -karagenana injicirano je u desni *m. gastrocnemius* životinja. Kontrolna skupina životinja i.m. je injicirana istim volumenom fiziološke otopine.  $\Lambda$ -karagenan uzrokuje primarnu mehaničku preosjetljivost na mjestu injiciranja i sekundarnu, na području desne šape, koja se širi na lijevu šapu unutar 2 tjedna (Radhakrishnan i sur., 2003.). U daljnjem tekstu naziv ipsilateralno označava desnu stranu, na kojoj je izazvana bol, a kontralateralno se odnosi na lijevu stranu, suprotnu izazivanju boli.

Pokus je trajao ukupno 3 tjedna. Sekundarna mehanička preosjetljivost mjerena je vFF svaki drugi dan. Životinje koje su razvile bilateralnu bol 2 tjedna nakon i.m. primjene karagenana korištene su u daljnjim pokusima.

U jednoj je seriji pokusa ispitan antinociceptivni učinak BT-A, injiciranog na različita mjesta: periferno, i.pl. u desnu šapu i u lijevu šapu, spinalno (i.t.) i supraspinalno (i.c.). Mehanička je preosjetljivost mjerena 5 dana nakon periferne primjene i 3 dana nakon primjene u SŽS.

U drugoj je seriji pokusa ispitan utjecaj naloksonazina, primijenjenog u spinalni kanal (i.t.) ili moždane komore (i.c.v.), i bikukulina, primijenjenog u spinalni kanal (i.t.) ili u *cisternu magnu* (i.c.), na antinociceptivni učinak ipsilateralno i.pl. primijenjenog BT-A. Mehanička se preosjetljivost mjerila 5 dana nakon periferne primjene BT-A i zatim 24 h nakon primjene naloksonazina ili 30 min nakon primjene bikukulina.

### **3.5.5 Peritonitis uzrokovan octenom kiselinom**

Intraperitonealna primjena 10 mL/kg 1%-tne octene kiseline uzrokuje u životinja visceralnu bol karakteriziranu abdominalnim grčevima (Koster i sur., 1959.). Grč je definiran pogrbljenošću leđa, istežanjem stražnjih udova i kontrakcijom abdominalnog mišićja. Životinje su promatrane tijekom 60 min te je bolno ponašanje kvantificirano brojanjem abdominalnih grčeva u navedenom vremenskom periodu. U ovom je modelu istraženo mjesto djelovanja BT-A. S obzirom da je praćeno bolno ponašanje neposredno nakon i.p. primjene octene kiseline, životinje su podvrgnute BT-A pred-tretmanu: i.pl. i i.c. BT-A je primijenjen 5 dana prije, a i.t. 2 dana prije izazivanja boli octenom kiselinom.

### **3.5.6 Kolitis i prenesena bol uzrokovana kapsaicinom**

200 µL 0.1%-tne otopine kapsaicina primijenjenog u kolon izaziva visceralnu bol karakteriziranu spontanim bolnim ponašanjem (pojavom abdominalnih grčeva) prvih 20 min, a potom razvojem prenesene mehaničke alodinije na područje ventralnog abdomena (Sanoja i sur., 2010.). Prije instilacije kapsaicina u kolon, perianalno područje je namazano vazelinom kako bi se izbjegao izravni kontakt s nadražujućom tvari. Otopina kapsaicina primijenjena je u kolon kroz anus pomoću prozirne kanile primjera 1 mm, 7 cm proksimalno od anokutane linije. Kontrolnim je životinjama i.col. primijenjena fiziološka otopina. Neposredno nakon primjene 0.1%-tnog kapsaicina ili f.o. u kolon, promatralo se i brojalo spontano bolno ponašanje u periodu od 20 min. Bolnim ponašanjem smatrana su kontrakcija abdomena, istežanje stražnjih udova, pogrbljenost i svijenost leđa (Sanoja i sur., 2010.). Nakon toga je pomoću vFF (1–26 g) mjerena prenesena mehanička alodinija na području abdomena. Mjerenje je provedeno istom metodom kako je prethodno opisano na području šape. Pri mjerenju se izbjegavalo genitalno područje i ponovljeno stimuliranje istog područja kako bi se prevenirala senzitivizacija.

U ovom je pokusu ispitan mjesto antinociceptivnog djelovanja BT-A. Životinje su testirane 5 dana nakon primjene BT-A kolon, odnosno 2 dana nakon i.t. primjene BT-A.

### 3.6 Analiza tkiva

Nakon provedenih bihevioralnih ispitivanja, životinje su žrtvovane radi uzimanja uzoraka senzornih ganglija, kralješnične moždine i mozga za biokemijske analize. Sve su analize izvedene na lumbalnim segmentima L3–L5 (područje inervacije *n. ischiadicus*), osim u modelima visceralne boli, gdje su zbog drugačije, ali i difuzne, inervacije analizirani samo sakralni S1–S4 segmenti (područje inervacije *n. splanchnicus pelvis*). Za potrebe imunofluorescencije tkivo kralješnične moždine i mozga pripremljeno je transkardijalnom perfuzijom primjenom 250 mL fiziološke otopine i potom 250 mL fiksativa (4%-tna otopina paraformaldehida u 0.01 M fosfatima puferiranoj fiziološkoj otopini (PBS), pH 7.4). Nakon krioprotekcije sukrozom (24 h 15%-tna otopina u fiksativu, zatim 24–48 h 30%-tna otopina u PBS-u) pohranjeno je na -80 °C do korištenja. Uzorci kralješnične moždine i senzornih ganglija za metodu qRT-PCR (engl. *Quantitative real time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) smrznuti su u tekućem dušiku i pohranjeni na -80 °C do korištenja.

#### 3.6.1 Imunofluorescencija

Smrznuto tkivo rezano je na kriostatu (CM1520, Leica Biosystems, Nussloch, Njemačka) na 30 µm (za imunodetekciju c-Fos, GFAP, CD11b i Leu/MetENK) ili 40 µm (za imunodetekciju cISNAP-25) tanke prereze te preneseno u PBS-om ispunjene jažice. Prerezi su ispirani 3 puta po 5 min primjenom PBS-T otopine (PBS + 0.25% TritonX-100), potom se nespecifično vezanje blokiralo 10%-tnim kozjim serumom, pa je provedena inkubacija primarnim protutijelom preko noći.

**Tablica 9** Koncentracije i načini inkubacije primarnih i sekundarnih protutijela

*Legenda: c-Fos–protein ranih gena, marker aktivacije neurona; GFAP–kiseli vlaknasti protein glije, marker astrocita; CD11b–protein integrinske porodice, marker mikroglije, Leu/MetENK–leucin i metionin enkefalin; cISNAP-25–fragment SNAP-25 proteina nastao cijepanjem BT-A*

Primarno protutijelo	Koncentracija	Način inkubacije	Sekundarno protutijelo	Koncentracija	Način inkubacije
c-Fos	1:500	sobna T	AlexaFluor448	1:400	sobna T
GFAP	1:1000	4 °C	AlexaFluor448	1:400	sobna T
CD11b	1:500	4 °C	AlexaFluor448	1:400	sobna T
Leu/MetENK	1:100	4 °C	AlexaFluor448	1:400	sobna T
cISNAP-25	1:1800	sobna T	AlexaFluor555	1:300	sobna T

Prerezi su isprani, postavljeni na mikroskopska stakalca (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka) i prekrivena medijem za očuvanje fluorescencije Fluorogel® te na kraju vizualizirani fluorescentnim mikroskopom, spojenim na DP-70 digitalnu kameru (Olympus, BX-51, Tokyo, Japan). U tablici 9 navedena su korištena primarna i sekundarna protutijela, koncentracije i način inkubacije. Analiza prereza provedena je primjenom *Cell Dimension* programske podrške. Reprezentativne slike pojedine eksperimentalne skupine su spojene u programu *Microsoft Paint*, a svjetlina i kontrast podešeni u programu *Adobe Photoshop*.

### 3.6.2 Lančana reakcija polimerazom s reverznom transkripcijom (qRT-PCR)

Za izolaciju RNA iz smrznutog tkiva lumbalnog dijela kralješnične moždine (L3–L5) i ganglija dorzalnih korjenova (L3, L4 i L5) koristili smo klasičnu metodu, prema Chomczynskiju i Sacchiju (1987.). Smrznuto tkivo je inkubirano u komercijalno dostupnom TRIzol® reagensu na ledu i homogenizirano primjenom Ultraturrax homogenizatora (Polytron PT 1600E, Kinematica, Luzern, Švicarska). Nakon toga je dodan kloroform i uzorci su centrifugirani na 13000 rpm i 4 °C 15 min. Gornjoj su fazi dodani glikogen i izopropanol. Nakon inkubacije i centrifugiranja pročišćena RNA je isprana 75%-tnim etanolom i otopljena u 33 µL dietil-pirokarbonatima tretirane vode (DEPC voda). Količina ekstrahirane mRNA je kvantificirana spektrofotometrijski (BioPhotometer®, Eppendorf, Hamburg, Njemačka), a integritet ekstrahirane RNA mjeren prema 260/280 omjeru.

Reverzna transkripcija je provedena pomoću *TaqMan*® reagenasa za reverznu transkripciju. Reakcijska smjesa je sadržavala 500 ng mRNA, 10x pufer za reverznu transkripciju, smjesu deoksinukleotida, MgCl<sub>2</sub>, nasumične heksamere, inhibitor RNAze i enzim *MultiScribe* reverznu transkriptazu. Ukupan volumen reakcijske smjese bio je 100 µL. Reakcija je provedena u uređaju *GeneAmp PCR System 9700 cycler* (Applied Biosystems, Darmstadt, Njemačka) uz uvjete: 10 min na 38 °C, potom 60 min na 48 °C i na kraju 25 min na 95 °C. 5 µL cDNA je uzeto za qRT-PCR analizu, koja je provedena u uređaju *GeneAmp 7700 sequence detection system* (Applied Biosystems, Darmstadt, Njemačka), koji mjeri fluorescenciju pomoću reagensa *TaqMan Universal Master Mix* (Applied Biosystems, Darmstadt, Njemačka). Reakcijska smjesa je sadržavala 12.5 µL *TaqMan Universal Master Mix* i 1.25 µL oligonukleotidne početnice (za štakorski TNFα, IL-1β ili µ-opioidni receptor), a do ukupnog volumena od 25 µL je dodana voda. Kao endogena kontrola korišten je gen za 18S rRNA (Gutala i Reddy, 2004.). Uvjeti PCR uređaja podešeni su na sljedeće cikluse: inkubacija 2 min na 50 °C, potom 10 min na 95 °C, te 40 ciklusa po 15 s na 95 °C i 1 min na

60 °C. Svaka PCR pločica je sadržavala tkivo netretirane skupine životinja kao kalibrator, čije su  $C_t$ -vrijednosti bile blizu izračunate srednje vrijednosti svih kontrolnih uzoraka. Apsolutna vrijednost kalibratora je podešena na 1, te su svi ostali uzorci promatrani u odnosu na kalibrator. Kako bismo osigurali specifičnost korištene oligonukleotidne početnice i isključili genomsku kontaminaciju, na svakoj su se PCR pločici nalazile i negativne kontrole bez cDNA predloška. Svi su uzorci mjereni u triplikatu, osim 18sRNA, koja je zbog stabilnosti mjerena u duplikatu. Procjena dobivenih rezultata izvedena je komparativnom  $DDC_t$ -metodom, prema opisu proizvođača (Korisničke upute #2 Applied Biosystems, P/N 4303859, 1997.) i drugih autora (Winer i sur., 1999.).  $C_t$  vrijednosti uzoraka normalizirane su prema endogenoj kontroli, a u odnosu na kalibrator. Taj je odnos opisan vrijednošću  $2DDC_t$ .

### **3.7 Statistička obrada podataka**

Rezultati bihevioralnih pokusa na eksperimentalnim modelima boli, kao i kvantitativni rezultati imunohistokemijske analize, izraženi su kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna srednja pogreška (engl. *standard error of mean*, SEM) i prikazani u obliku grafikona sa stupcima. Nakon jednosmjerne analize varijance (engl. *One-way ANOVA*), razlike između skupina analizirane su Tukey *post hoc* testom. Značajne su sve P vrijednosti manje od 0.05 ( $P < 0.05$ ).

U analizi podataka iz qRT-PCR korišten je neparametrijski Mann-Whitneyjev U test, kojim su se međusobno uspoređivale po dvije skupine, a rezultati su izraženi kao medijan i pripadajući interkvartilni raspon („*box and whisker plot*“). Sve P vrijednosti manje od 0.05 smatrane su značajnima. U analizi je korištena programska podrška *IBM SPSS statistics 20*.

## **4 REZULTATI**



## **4.1 Periferno primijenjeni BT-A aktivira inhibicijske neurotransmitske sustave na spinalnoj razini**

Do sada je opisano nekoliko promjena na razini kralješnične moždine nakon periferne primjene BT-A, većinom u modelima upalne boli. To su: smanjena ekspresija proteina ranih gena poput c-Fos, ERK, smanjena ekspresija CaMKII te smanjena ekspresija molekula uključenih u nocicepciju poput COX-2, EP4 receptora i CGRP-a (v. Uvod, tablica 6). U modelima upalne i neuropatske boli pokazano je da periferno primijenjeni BT-A smanjuje ekspresiju GFAP i CD11b. No osim ovih nalaza, nije istraženo koji bi središnji neurotransmitori, osim CGRP-a, mogli biti uključeni u antinociceptivno djelovanje BT-A. U pokušaju rasvjetljavanja središnjeg molekularnog mehanizma djelovanja BT-A svrha ovih pokusa bila je istražiti i okarakterizirati potencijalnu uključenost endogenog opioidnog i GABA-ergičkog sustava u antinociceptivno djelovanje BT-A u patofiziološki različitim modelima boli: upalnoj, neuropatskoj i bilateralnoj mišićnoj boli. S obzirom da su dosadašnji učinci na razini SŽS-a većinom izolirani na pojedine modele, cilj ovih pokusa je bio utvrditi jesu li potencijalni učinci BT-A na neurotransmitske sustave istražene u ovom doktorskom radu ovisni o modelu ili BT-A ima univerzalni mehanizam djelovanja u različitim modelima.

### **4.1.1 Uključenost endogenog opioidnog sustava u antinociceptivni učinak BT-A**

U modelima upalne i neuropatske boli istraženi su učinci neselektivnog opioidnog antagonista naltreksona i selektivnog  $\mu$ -opioidnog antagonista naloksonazina na antinociceptivno djelovanje i.pl. BT-A. Ispitivao se učinak različitih doza antagonista na antinociceptivno djelovanje BT-A te mjesto interakcije. Osim na bihevioralne pokazatelje boli u pojedinom modelu, istraženi su i utjecaji na aktivaciju neurona i glija stanica te ekspresiju proupalnih citokina,  $\mu$ -opioidnih receptora i Leu/Met-enkefalina u dorzalnog rogu kralješnične moždine.

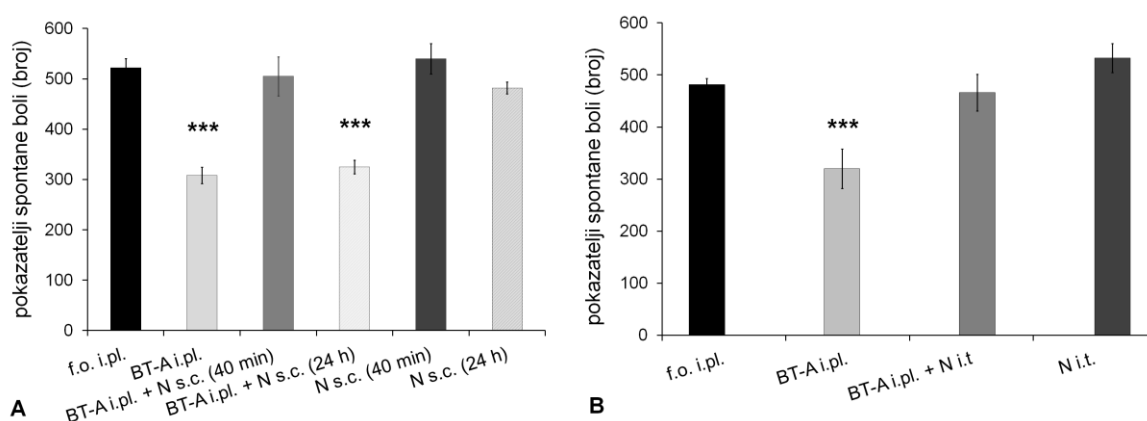
#### **4.1.1.1 Upalna bol uzrokovana formalinom**

BT-A (5 i.j./kg), primijenjen 5 dana prije izvođenja formalinskog testa, značajno je smanjio broj bolnih odgovora u drugoj fazi testa (15–60 min nakon injiciranja formalina) ( $P < 0.01$ ). Na akutnu bol (0–15 min) nije djelovao, što je prethodno već pokazano (Cui i sur., 2004.; Luvisetto i sur., 2006.). Naltrekson (2 mg/kg) primijenjen sistemski (s.c.) 40 min prije formalinskog testa poništio je antinociceptivno djelovanje BT-A ( $P < 0.01$ ). U našem je

eksperimentu korištena doza naltreksona koja nije utjecala na formalinom uzrokovanu bol (slika 7,  $p=0.6$ ).

Dodatno je istraženo trajanje inhibicijskog djelovanja naltreksona na antinociceptivni učinak BT-A. U skladu sa svojim farmakokinetičkim svojstvima, naltrekson primijenjen 24 h prije formalinskog testa nije utjecao na antinociceptivno djelovanje BT-A, što znači da blokira djelovanje BT-A samo za vrijeme prisutnosti u organizmu, odnosno zauzeća opioidnih receptora.

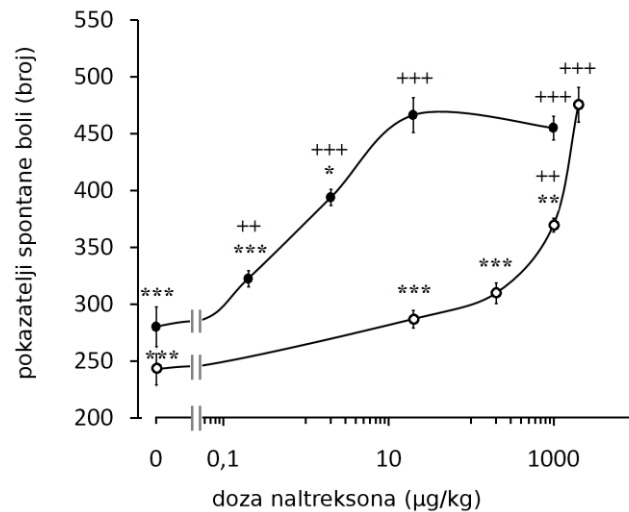
S obzirom na središnje djelovanje BT-A na nocicepciju, u sljedećem pokusu ispitano je odvija li se interakcija BT-A s opioidnim sustavom na spinalnoj razini. U ovom je pokusu naltrekson ( $7 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ ; tj.  $0.02 \text{ mg/kg}$ ) injiciran središnje (i.t.). Slično poput 100 puta veće sistemski primijenjene doze ( $2 \text{ mg/kg}$ ), naltrekson i.t. je poništio antinociceptivno djelovanje i.pl. primijenjenog BT-A ( $P<0.01$ ), dok sam nije utjecao na bolne odgovore uzrokovane formalinom. Za razliku od središnje primjene, ista doza primijenjena sistemski ( $7 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ ) nije utjecala na antinociceptivno djelovanje BT-A (slika 7).



**Slika 7** Učinak opioidnog antagonista naltreksona (N) na antinociceptivno djelovanje BT-A u drugoj fazi formalinskog testa. Mjerenje je izvedeno 5 dana nakon i.pl. injekcije BT-A ( $5 \text{ i.j./kg}$ ): A) 40 min i 24 h nakon s.c. primjene naltreksona ( $2 \text{ mg/kg}$ ); B) 40 min nakon i.t. primjene naltreksona ( $7 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ ). **A) Naltrekson primijenjen 40 min prije formalinskog testa blokira antinociceptivno djelovanje BT-A, dok naltrekson primijenjen 24 h prije nema učinka.** Aritmetička sredina  $\pm$  SEM,  $n=5-6$ ; \*\*\*  $P<0.001$  u odnosu na kontrolu i BT-A i.pl.+ N s.c.(40min); **B) Niska doza intratekalnog naltreksona blokira učinak BT-A na formalinom uzrokovanu bol.** Aritmetička sredina  $\pm$  SEM,  $n=5$ ; \*\*\*  $P<0.001$  u odnosu na kontrolu i BT-A i.pl. + N i.t. (Tukey *post hoc*)

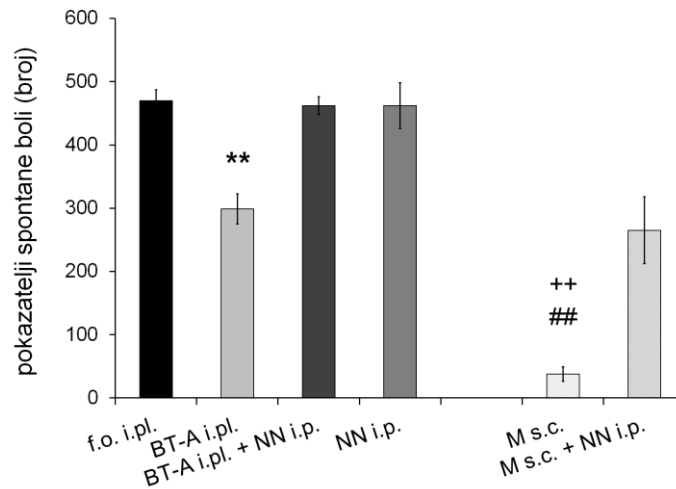
Promatrani je učinak naltreksona na antinociceptivno djelovanje BT-A ovisan o dozi naltreksona (Slika 8). Ovisnost učinka o dozi ispitana je za oba načina primjene: sistemski s.c. ( $2 \text{ mg/kg}$ ,  $1 \text{ mg/kg}$ ,  $0.2 \text{ mg/kg}$  i  $0.02 \text{ mg/kg}$ ) i središnje i.t. ( $350 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ ,  $7 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ ,  $0.7 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$  i  $0.07 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ ). Najviše ispitane doze naltreksona ( $2 \text{ mg/kg}$  s.c. ili  $7 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$  i.t.) potpuno su poništile djelovanje BT-A na upalnu bol ( $P<0.001$ ). Snižavanjem doza

naltreksona, uočeno je smanjenje u inhibiciji antinociceptivnog učinka BT-A. Kako bi se isključilo djelovanje samog antagonista, istraženi su i učinci najviših primijenjenih doza naltreksona (10 mg/kg s.c. i 350 µg/10 µL i.t.) te je pokazano da naltrekson ne utječe na formalinom uzrokovanu bol (broj bolnih odgovora:  $454.6 \pm 20.7$  u odnosu na kontrolnu skupinu tretiranu f.o. s.c.  $489.8 \pm 15.2$  i  $485.8 \pm 16.4$  u odnosu na f.o. i.t.  $494 \pm 22.7$ ).



**Slika 8 Učinak različitih doza naltreksona, injiciranog sistemski ili intratekalno, na antinociceptivno djelovanje periferno primijenjenog BT-A u drugoj fazi formalinskog testa.** Mjerenja su izvedena 5 dana nakon i.pl. primjene BT-A (5 i.j./kg) i 40 min nakon s.c. primjene naltreksona u dozama 2 mg/kg, 1 mg/kg, 0.2 mg/kg i 0.02 mg/kg ili i.t. primjene u dozama 350 µg/10 µL, 7 µg/10 µL, 0.7 µg/10 µL, 0.07 µg/10 µL. Vrijednost doze naltreksona 0 odgovara broju bolnih odgovora nakon tretmana samim BT-A. Na x-osi je logaritamska skala. Aritmetička sredina  $\pm$  SEM, n=5;  $\circ$  (prazni krugovi) naltrekson s.c.: \*\* P<0.01 u odnosu na kontrolu, \*\*\* P<0.001 u odnosu na kontrolu, ++ P<0.01 u odnosu na BT-A, +++ P<0.001 u odnosu na BT-A;  $\bullet$  (ispunjeni krugovi) naltrekson i.t.: \* P<0.05 u odnosu na kontrolu, \*\* P<0.01 u odnosu na kontrolu, \*\*\* P<0.001 u odnosu na kontrolu, ++ P<0.01 u odnosu na BT-A, +++ P<0.001 u odnosu na BT-A (Tukey *post hoc*)

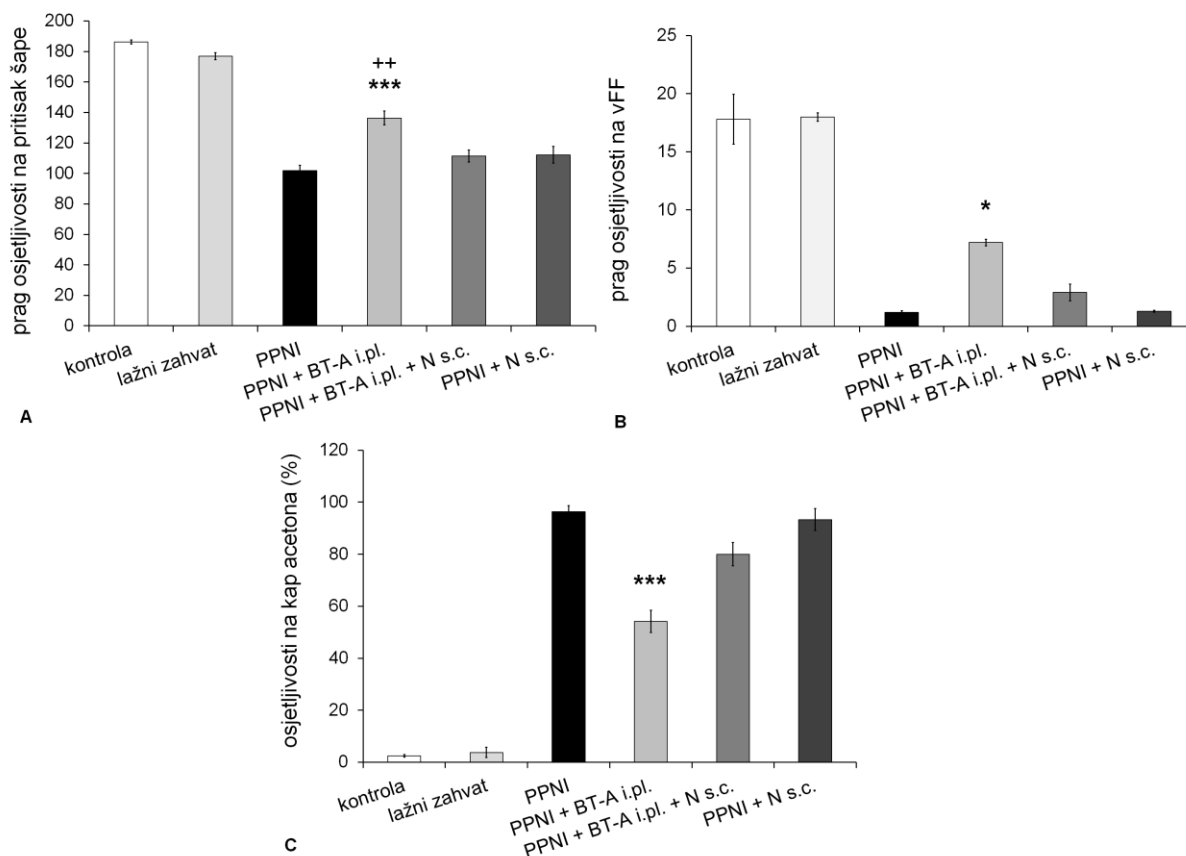
S obzirom da je naltrekson neselektivni antagonist opioidnih  $\mu$ -,  $\delta$ - i  $\kappa$ -receptora, u dodatnom je pokusu cilj bio ispitati učinak selektivnog  $\mu$ -opioidnog antagonista naloksonazina na antinociceptivni učinak BT-A. Slično poput neselektivnog naltreksona, i.p. primjena naloksonazina (5 mg/kg) 24 h prije formalinskog testa, poništila je antinociceptivni učinak BT-A na upalnu bol (slika 9, P<0.01). U korištenoj dozi sam naloksonazin nije utjecao na nocicepciju u formalinskom testu.



**Slika 9** Naloksonazin antagonizira antinociceptivni učinak BT-A u drugoj fazi formalinskog testa. Učinak na pozitivnu kontrolu, morfin, je djelomičan. Mjerenje je izvedeno 5 dana nakon i.pl. primjene BT-A (5 i.j./kg), 24 h nakon i.p. primjene naloksonazina (5 mg/kg) i 40 min nakon s.c. primjene morfina (6 mg/kg). Aritmetička sredina  $\pm$  SEM, n=6; \*\* P<0.01 u odnosu na f.o. i.pl., BT-A i.pl.+NN i.p. i NN i.p., ++ P<0.01 u odnosu na f.o. i.pl., BT-A i.pl.+NN i.p., ## P<0.01 u odnosu na M s.c. + NN i.p. (Tukey *post hoc*)

#### 4.1.1.2 Neuropatska bol uzrokovana djelomičnim presijecanjem ishijadičnog živca

Dva tjedna nakon djelomičnog presijecanja ishijadičnog živca životinje s eksperimentalnom neuropatskom boli razvile su mehaničku hiperalgeziju i alodiniju te hladnu alodiniju. Prag mehaničkog podražaja mjeren metodom pritiska šape i primjenom vFF, kao i na podražaj koji hladi (kap acetona), bili su značajno niži u odnosu na kontrolne netretirane životinje i životinje s „lažnim“ zahvatom (kojima nije zarezan živac). BT-A (7 i.j./kg), injiciran i.pl. životinjama koje su razvile eksperimentalnu neuropatsku bol, smanjio je mehaničku hiperalgeziju (P<0.01, slika 10a), mehaničku alodiniju (P<0.01, slika 10b) i hladnu alodiniju (P<0.01, slika 10c) 5 dana nakon primjene. Naltrekson (2 mg/kg), koji je primijenjen s.c. 5 dana nakon primjene BT-A, a 40 min prije samih testova poništio je djelovanje BT-A na mehaničku hiperalgeziju (slika 10a) te smanjio učinke BT-A na mehaničku i hladnu alodiniju (slike 10b,c), dok sam nije utjecao na bol u navedenim testovima nocicepcije.



**Slika 10** Sistemski primijenjen naltrekson blokira antinociceptivno djelovanje BT-A u eksperimentalnom modelu neuropatske boli uzrokovane PPNI. Nocicepcijski testovi su izvedeni 5 dana nakon injiciranja BT-A (7 i.j., i.pl.) i 40 min nakon injiciranja naltreksona (2 mg/kg, s.c.) životinjama koje su razvile eksperimentalnu neuropatsku bol. Neuropatska se bol razvila na ipsilateralnoj strani (strani djelomično presječenog živca), te su na grafovima prikazani rezultati mjerenja na ipsilateralnoj šapi. **A) Mehanička osjetljivost mjerena testom pritiska šape**; rezultati izraženi u gramima. Aritmetička sredina  $\pm$  SEM, n=5-6; \*\*\* P<0.001 u odnosu PPNI i PPNI + BT-A i.pl. + N s.c., ++ P<0.01 u odnosu na PPNI + N s.c. (Tukey *post hoc*). **B) Mehanička osjetljivost mjerena von Freyjevimi filamentima**; rezultati izraženi u gramima. Aritmetička sredina  $\pm$  SEM, n=5-6; \* P<0.05 u odnosu na PPNI, PPNI + BT-A i.pl. + N s.c. i PPNI + N s.c. (Tukey *post hoc*). **C) Hladna alodinija mjerena acetonom**; rezultati izraženi kao postotak povlačenja/lizanja šape uzrokovane primjenom kapi 100% acetona. Aritmetička sredina  $\pm$  SEM, n=5-6; \*\*\* P<0.001 u odnosu na PPNI, PPNI + BT-A i.pl. + N s.c. i PPNI + N s.c. (Tukey *post hoc*)

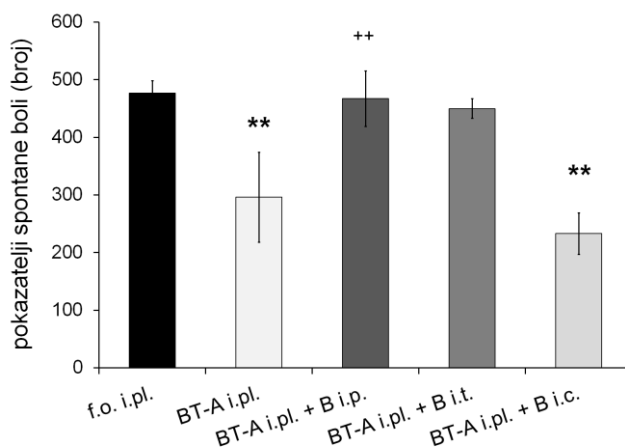
Prikazani rezultati s opioidnim antagonistima (slike 7-10) objavljeni su u znanstvenom radu: Drinovac V, Bach-Rojecky L, Matak I, Lacković Z (2013) Involvement of  $\mu$ -opioid receptors in antinociceptive action of botulinum toxin type A. *Neuropharmacology* 70: 331-337.

#### 4.1.2 Uključenost GABA-ergičkog sustava u antinociceptivno djelovanje BT-A

U ovoj je seriji pokusa ispitan utjecaj GABA<sub>A</sub> antagonista bikukulina, injiciranog sistemski (i.p.), spinalno (i.t.) i supraspinalno (i.c.), na antinociceptivni učinak periferno primijenjenog BT-A u modelima upalne i neuropatske boli.

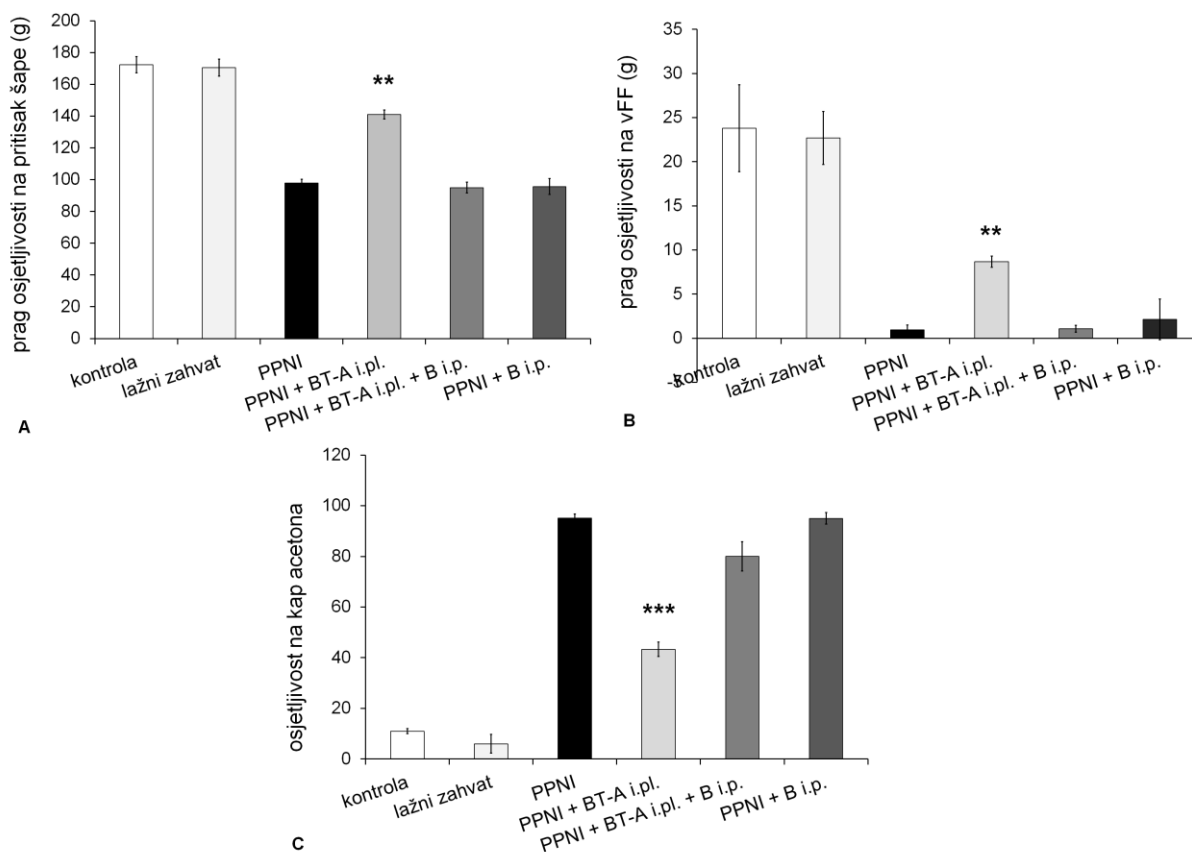
Slično naltreksonu, sistemska primjena bikukulina (2 mg/kg i.p.) 40 min prije formalinskog testa spriječila je antinociceptivni učinak periferno primijenjenog BT-A (5 i.j./kg) u drugoj

fazi testa ( $P < 0.01$ , slika 11), kao i niska doza ( $1 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ ) primijenjena i.t. ( $P < 0.01$ , slika 11). Međutim, nakon primjene u *cisternu magnu* ( $1 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ ) nije imao učinak na antinociceptivno djelovanje BT-A. Bikukulin, primijenjen i.p., i.t. i i.c. u navedenim dozama, nije utjecao na bolno ponašanje uzrokovano i.pl. formalinom.



**Slika 11** Učinak bikukulina na antinociceptivno djelovanje BT-A u drugoj fazi formalinskog testa: BT-A ( $5 \text{ i.j./kg}$ , i.pl.) je primijenjen 5 dana prije izvođenja formalinskog testa, a bikukulin (i.p.  $2 \text{ mg/kg}$ , i.t.  $1 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$  i i.c.  $1 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ ) 40 min prije testa. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina  $\pm$  SEM,  $n=5-6$ , \*\*  $P < 0.01$  u odnosu na f.o. i.pl., BT-A i.pl. + B i.p. i BT-A i.pl. + B i.t., ++  $P < 0.01$  u odnosu na BT-A i.pl. i BT-A i.pl. + B i.c. (Tukey *post hoc*)

Sličan je rezultat dobiven i u modelu neuropatske boli, gdje je bikukulin ( $2 \text{ mg/kg}$  i.p.) blokirao učinke BT-A na mehaničku hiperalgeziju ( $P < 0.01$ ) te mehaničku ( $P < 0.01$ ) i hladnu alodiniju ( $P < 0.01$ ) (slika 12).



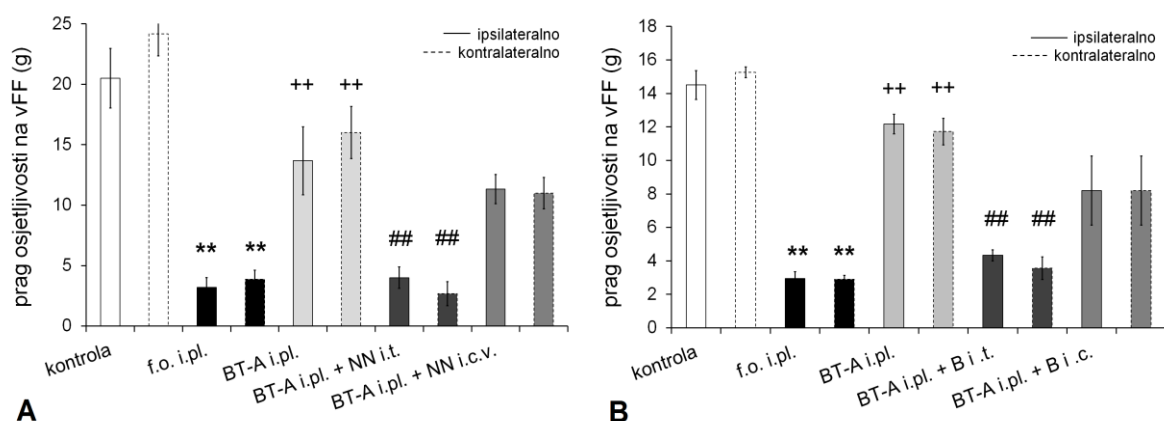
**Slika 12 Sistemski primijenjen bikukulin u eksperimentalnoj neuropatskoj boli uzrokovanoj PPNI blokira antinociceptivno djelovanje BT-A.** Nocicepcijski testovi su izvedeni 5 dana nakon injiciranja BT-A (7 i.j., i.pl.) i 40 min nakon injiciranja bikukulina (2 mg/kg, i.p.) životinjama koje su razvile eksperimentalnu neuropatsku bol. Neuropatska se bol razvila na ipsilateralnoj strani (strani djelomično presječenog živca), te su na grafovima prikazani rezultati mjerenja na ipsilateralnoj šapi. **A) Mehanička osjetljivost mjerena testom pritiska šape;** rezultati izraženi u gramima. Aritmetička sredina  $\pm$  SEM, n=5-6; \*\* P<0.01 u odnosu PPNI, PPNI + BT-A i.pl. +B i.p. i PPNI + B i.p. (Tukey *post hoc*). **B) Mehanička osjetljivost mjerena von Freyjevim filamentima;** rezultati izraženi u gramima. Aritmetička sredina  $\pm$  SEM, n=5-6; \*\* P<0.01 u odnosu na PPNI, PPNI + BT-A i.pl. + B i.pl. i PPNI + B i.pl. (Tukey *post hoc*). **C) Hladna alodinija mjerena acetonom;** rezultati izraženi kao postotak povlačenja/lizanja šape uzrokovane primjenom kapi 100% acetona. Aritmetička sredina  $\pm$  SEM, n=5-6; \*\*\* P<0.001 u odnosu na PPNI, PPNI + BT-A i.pl. + B i.pl. i PPNI + B i.pl. (Tukey *post hoc*).

Prikazani rezultati s GABA antagonistom bikukulinom (slike 10–12) objavljeni su u znanstvenom radu: Drinovac V, Bach-Rojecky L, Lacković Z (2014) Association of antinociceptive action of botulinum toxin type A with GABA-A receptor. *J Neural Transm (Vienna)* **121(6)**: 665-669.

#### 4.1.3 Bilateralni antinociceptivni učinak BT-A nakon unilateralne primjene: interakcija s opioidnim i GABA-ergičkim sustavom na spinalnoj razini

Zbog posebnosti bilateralnog modela boli, cilj je bio dodatno ispitati je li i bilateralni antinociceptivni učinak periferno primijenjenog BT-A posredovan središnjim mehanizmima koji uključuju opioidni i GABA-ergički sustav te na kojoj se razini moguće interakcije

odvijaju. BT-A (7 i.j./kg) je injiciran i.pl. ipsilateralno životinjama s razvijenom obostranom preosjetljivošću uzrokovanom i.m. injiciranjem 3% otopine karagenana te je ispitan utjecaj  $\mu$ -opioidnog antagonista naloksonazina i GABA<sub>A</sub> antagonista bikukulina na bilateralno antinociceptivno djelovanje BT-A. Intratekalna primjena niske doze naloksonazina (1.5  $\mu$ g/10  $\mu$ L), 5 dana nakon primjene BT-A, a 1 dan prije testiranja mehaničkog podražaja, poništila je bilateralni antinociceptivni učinak BT-A ( $P < 0.01$  za obje strane) (slika 13). Ista doza u istim vremenskim točkama primijenjena i.c.v. nije utjecala na bilateralno djelovanje BT-A. Ispitana doza naloksonazina, primijenjena i.t. ili i.c.v., nije imala učinak na karagenanom uzrokovanu obostranu mehaničku preosjetljivost. Slično naloksonazinu, i.t. bikukulin (1  $\mu$ g/10  $\mu$ L), primijenjen 40 min prije testiranja nocicepcije, poništio je bilateralno djelovanje periferno primijenjenog BT-A ( $P < 0.01$ ), ali primijenjen supraspinalno (u *cisternu magnu*) nije interferirao s antinociceptivnim učinkom BT-A (slika 13). Ni u ovom slučaju, korištena doza bikukulina nije utjecala na bolno ponašanje mjereno vFF (slika 13).



**Slika 13 Bilateralni antinociceptivni učinak BT-A u modelu bilateralne boli uzrokovane unilateralnom i.m. primjenom karagenana uključuje interakciju sa spinalnim opioidnim i GABA-ergičkim sustavom.** Mjerenje sekundarne mehaničke preosjetljivosti na vFF provedeno je 5 dana nakon primjene BT-A (5 i.j./kg, ipsilateralno i.pl.) i: **A) 24 h nakon i.t. ili i.c.v. injekcije naloksonazina (1.5  $\mu$ g/ 10  $\mu$ L); B) 30 min nakon i.t. ili i.c. injekcije bikukulina (1  $\mu$ g/ 10  $\mu$ L)** Kontrola = životinje tretirane i.m. fiziološkom otopinom; ostale skupine = životinje tretirane i.m. karagenanom. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina  $\pm$  SEM, n=6, \*\*  $P < 0.01$  u odnosu na kontrolu, ++  $P < 0.01$  u odnosu na f.o. i.pl., ##  $P < 0.01$  u odnosu na BT-A i.pl. (Tukey *post hoc*)

*Prikazani rezultati ispitivanja uključenosti opioidnog i GABA-ergičkog sustava u djelovanje BT-A dobiveni na modelu bilateralne boli (slika 13) objavljeni su u znanstvenom radu: Drinovac Vlah V, Bach-Rojecky L, Lacković Z (2016) Antinociceptive action of botulinum toxin type A in carrageenan-induced mirror pain. J Neural Transm (Vienna) 123(12): 1403-1413.*



## **4.2 Interakcija BT-A s endogenim opioidnim sustavom smanjuje neuronalnu aktivaciju u dorzalnom rogu**

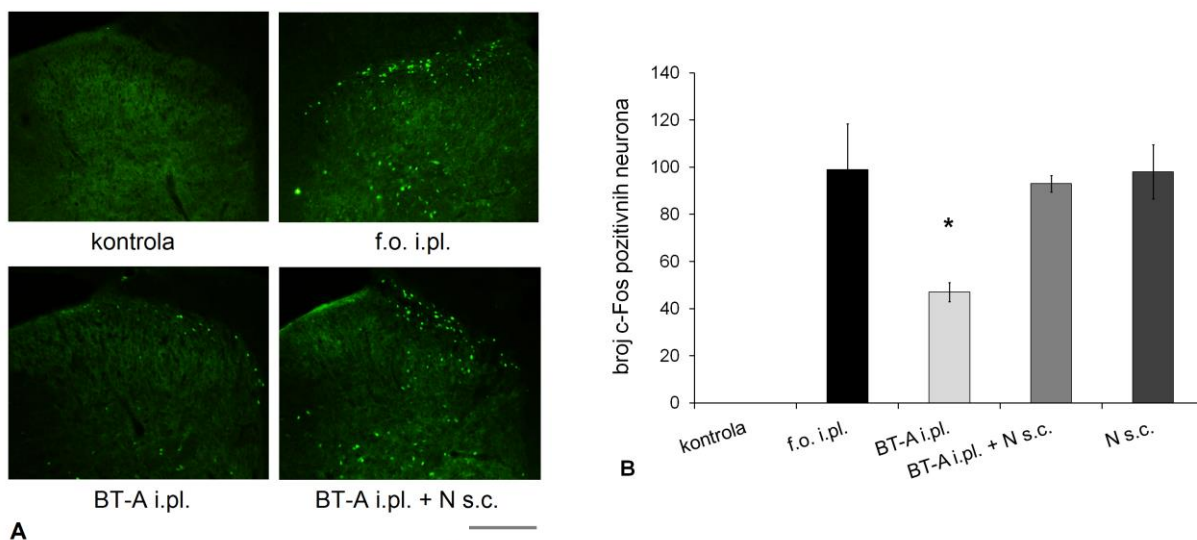
Analizom tkiva iz prethodnih pokusa cilj je bio utvrditi uključuje li interakcija BT-A i endogenog opioidnog sustava neuronalne i/ili glija stanice te na koji način BT-A aktivira endogeni opioidni sustav: mijenjanjem lučenja endogenih opioidnih peptida i/ili utjecajem na broj opioidnih receptora. Aktivaciju neurona i glija stanica detektirali smo metodom imunohistokemije i primjenom primarnih protutijela za specifične markere aktivacije: c-Fos za neurone, GFAP za astrocite te CD11b za mikroglia stanice. S obzirom da su bihevioralna ispitivanja ukazala na to da je interakcija BT-A s endogenim opioidnim sustavom najvjerojatnije povezana s  $\mu$ -opioidnim receptorom, istražili smo promjene u ekspresiji mRNA  $\mu$ -opioidnih receptora, ali i pentapeptida Leu/Met-enkefalina.

### **4.2.1 Aktivacija neuronalnih stanica u dorzalnom rogu kralješnične moždine**

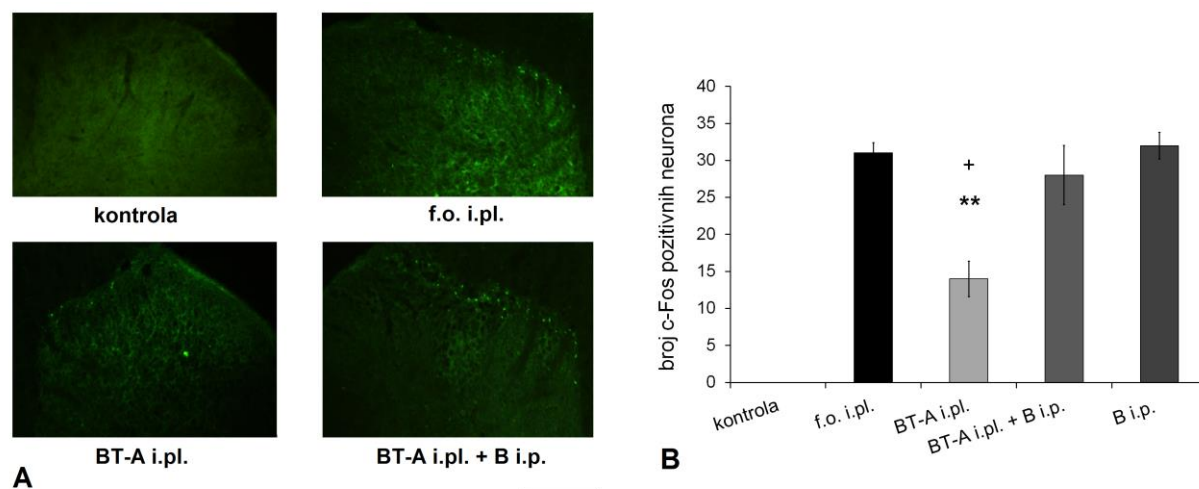
Aktivacija neurona, odnosno ekspresija c-Fos proteina, ispitana je u dorzalnom rogu kralješnične moždine (L4–L5) metodom imunofluorescencije u akutnom modelu boli (formalinski test). Promjene ekspresije c-Fos proteina bile su u skladu s promatranim bihevioralnim nalazima (slika 14). Analizom fotografija prereza utvrđeno je smanjenje broja c-Fos pozitivnih neurona ( $P < 0.05$ , slika 14) u životinja tretiranih s BT-A (5 i.j./kg i.pl.) u odnosu na životinje tretirane s fiziološkom otopinom. Naltrekson (2 mg/kg s.c.) je poništio učinak BT-A na ekspresiju c-Fos proteina ( $P < 0.05$ ). Kontralateralno neuronalna aktivacija nije primijećena.

Za razliku od neurona aktiviranih 2 h nakon uzrokovanja boli, u istoj vremenskoj točki nije uočena aktivacija glija stanica.

Slično kao i naltrekson, bikukulin je u dorzalnom rogu kralješnične moždine inhibirao učinak BT-A na ekspresiju c-Fos proteina ( $P < 0.05$ , slika 15).



**Slika 14** Opioidni antagonist naltrekson poništava učinak BT-A na ekspresiju c-Fos proteina. **A)** Ekspresija imunofluorescentno obilježenog c-Fos proteina (točkasta zelena imunoreaktivnost) u ipsilateralnim površinskim laminama L4/L5 prereza kralješnične moždine. Reprezentativni primjerci 10x uvećanih fotografija. Mjerilo (linija ispod fotografije prereza): 200  $\mu$ m. **B)** Kvantitativna analiza ekspresije c-Fos u senzornim laminama prereza kralješnične moždine. Ukupan broj c-Fos pozitivnih neurona u površinskim senzornim laminama kralješnične moždine kontrole i eksperimentalnih skupina tretiranih formalinom. Prosječan broj c-Fos obilježenih neurona za svaku životinju izračunat je iz 3 prereza. Aritmetička sredina  $\pm$  SEM, n=4; \* P<0.05 u odnosu na kontrolu, f.o. i.pl., N s.c. i BT-A i.pl. + N s.c. (Tukey *post hoc*)



**Slika 15** Bikukulin poništava učinak BT-A na ekspresiju c-Fos proteina. **A)** Ekspresija c-Fos proteina (zelena točkasta imunoreaktivnost) u ipsilateralnim površinskim senzornim laminama prereza L4 lumbalnog segmenta kralješnične moždine. Reprezentativni primjerci 10x uvećanih fotografija pojedinih eksperimentalnih skupina, slikanih digitalnom kamerom spojenom na mikroskop. Mjerilo (linija ispod fotografije prereza): 200  $\mu$ m. **B)** Kvantitativna analiza c-Fos ekspresije u laminama I i II, s 10x uvećanih fotografija. Ukupan broj c-Fos pozitivnih neurona u površinskim senzornim laminama kralješnične moždine kontrole i eksperimentalnih skupina tretiranih formalinom. Prosječan broj c-Fos pozitivnih neurona za svaku životinju izračunat je iz 3 prereza. Aritmetička sredina  $\pm$  SEM, n=4, \*\* P<0.01 u odnosu na f.o. i.pl., + P<0.05 u odnosu na BT-A i.pl. + B i.p. (Tukey *post hoc*)

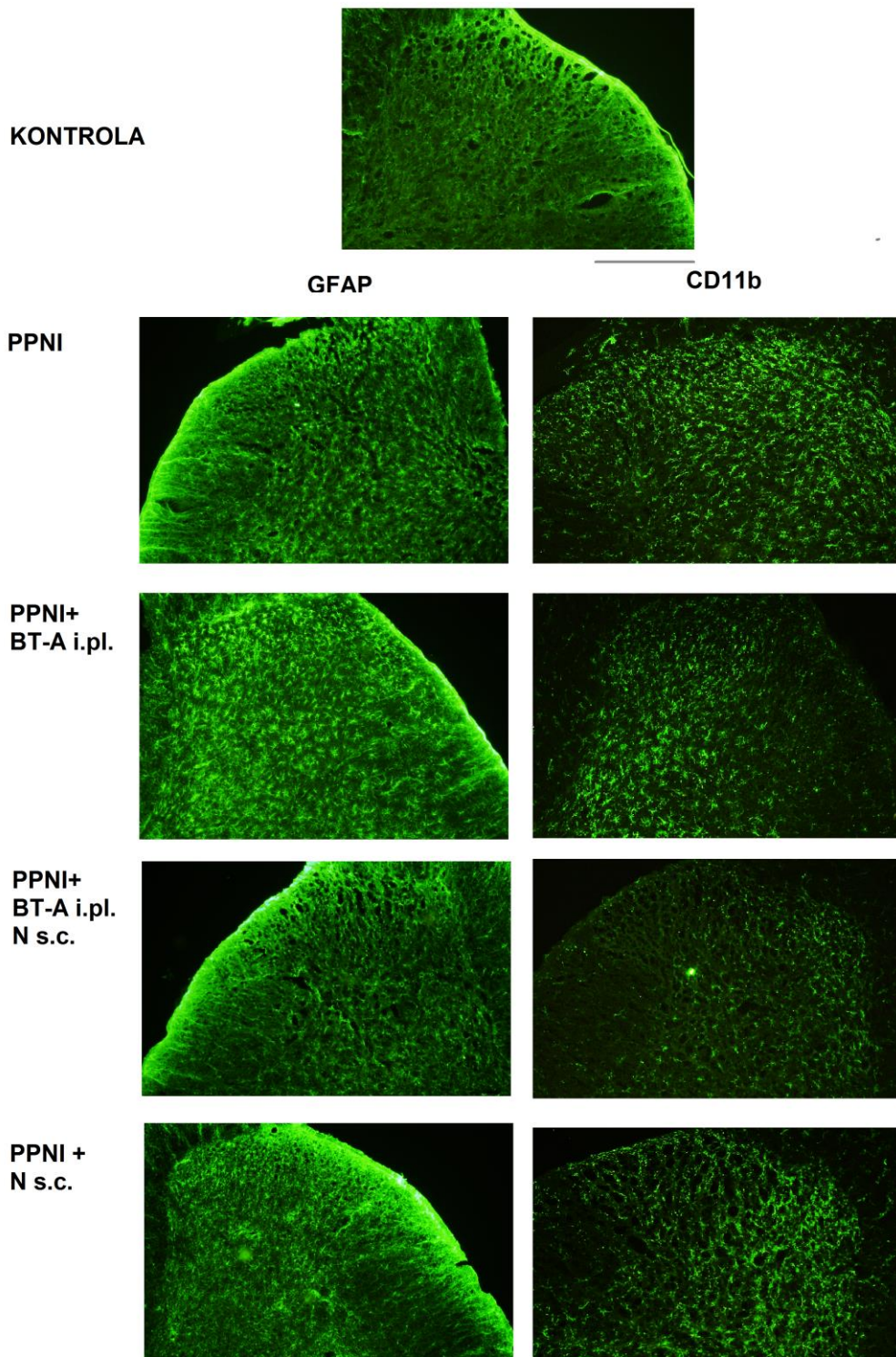
Rezultati ovih analiza dio su objavljenih znanstvenih radova:

- Drinovac V, Bach-Rojecky L, Matak I, Lacković Z (2013) Involvement of  $\mu$ -opioid receptors in antinociceptive action of botulinum toxin type A. *Neuropharmacology* **70**: 331-337 (Slika 14); i
- Drinovac V, Bach-Rojecky L, Lacković Z (2014) Association of antinociceptive action of botulinum toxin type A with GABA-A receptor. *J Neural Transm (Vienna)* **121(6)**: 665-669 (Slika 15).

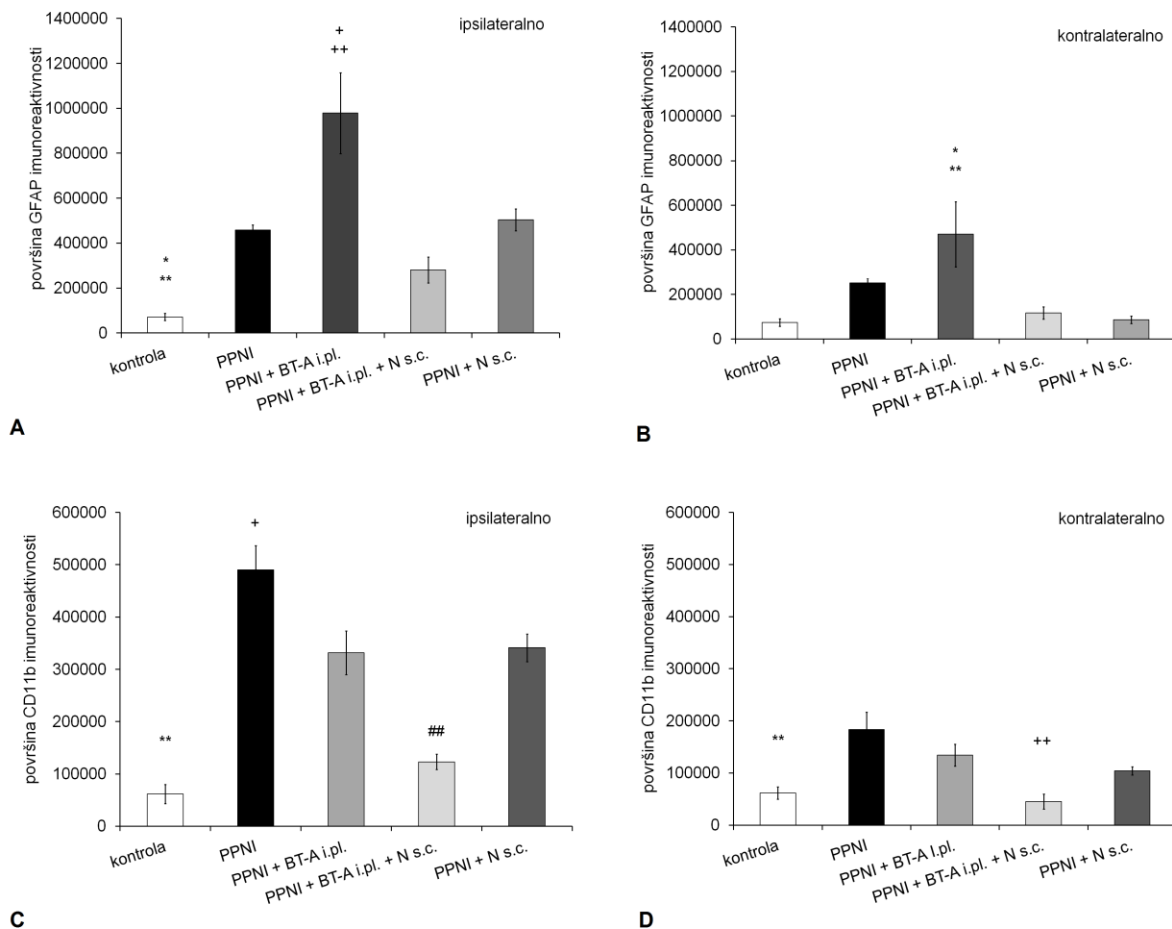
#### **4.2.2 Aktivacija glija stanica u dorzalnog rogu kralješnične moždine**

Aktivacija glija stanica, odnosno ekspresija proteina GFAP i CD11b, ispitana je metodom imunofluorescencije u lumbalnom L3–L5 dorzalnog rogu kralješnične moždine u modelu kronične boli (neuropatska bol uzrokovana PPNI). Tri tjedna nakon uzrokovanja ozljede živca u životinja s eksperimentalnom neuropatijom uočena je povećana ekspresija proteina citoskeleta astrocita GFAP ( $P < 0.05$ ) i proteina integrinske porodice na površini mikroglia stanica CD11b ( $P < 0.01$ ) u odnosu na životinje s lažnim zahvatom. Porast ekspresije bio je obostran, ali ipsilateralno veći nego kontralateralno ( $P < 0.01$ ). BT-A primijenjen 2 tjedna nakon PPNI povećao je ekspresiju GFAP ( $P < 0.05$ ), a smanjio ekspresiju CD11b ( $P < 0.05$ ) u odnosu na skupinu životinja s eksperimentalnom neuropatijom. Naltrekson je smanjio ekspresiju GFAP, dok na ekspresiju CD11b nije djelovao. Kombinacija BT-A i naltreksona smanjila je ekspresiju oba markera glija stanica (slike 16 i 17).

Premda se čini da dobiveni rezultati ekspresije markera glija stanica u životinja tretiranih s BT-A (7 i.j./kg i.pl.) i/ili naltreksonom (2 mg/kg s.c.) nisu u skladu s učincima ovih tvari na mehaničku hiperalgeziju te mehaničku i hladnu alodiniju, ne mogu se izvesti konačni zaključci budući da se u modelima kronične boli različite vrste glija stanica aktiviraju u različitim vremenskim intervalima.



**Slika 16** Aktivacija astrocita (ekspresija proteina GFAP) i mikroglije (ekspresija proteina CD11b) u L4 ipsilateralnom dorzalnom rogu kralješnične moždine. Reprezentativni primjeri 10x uvećanih fotografija pojedinih eksperimentalnih skupina, slikanih digitalnom kamerom spojenom na mikroskop. Mjerilo (linija ispod prereza kontrole): 100  $\mu$ m



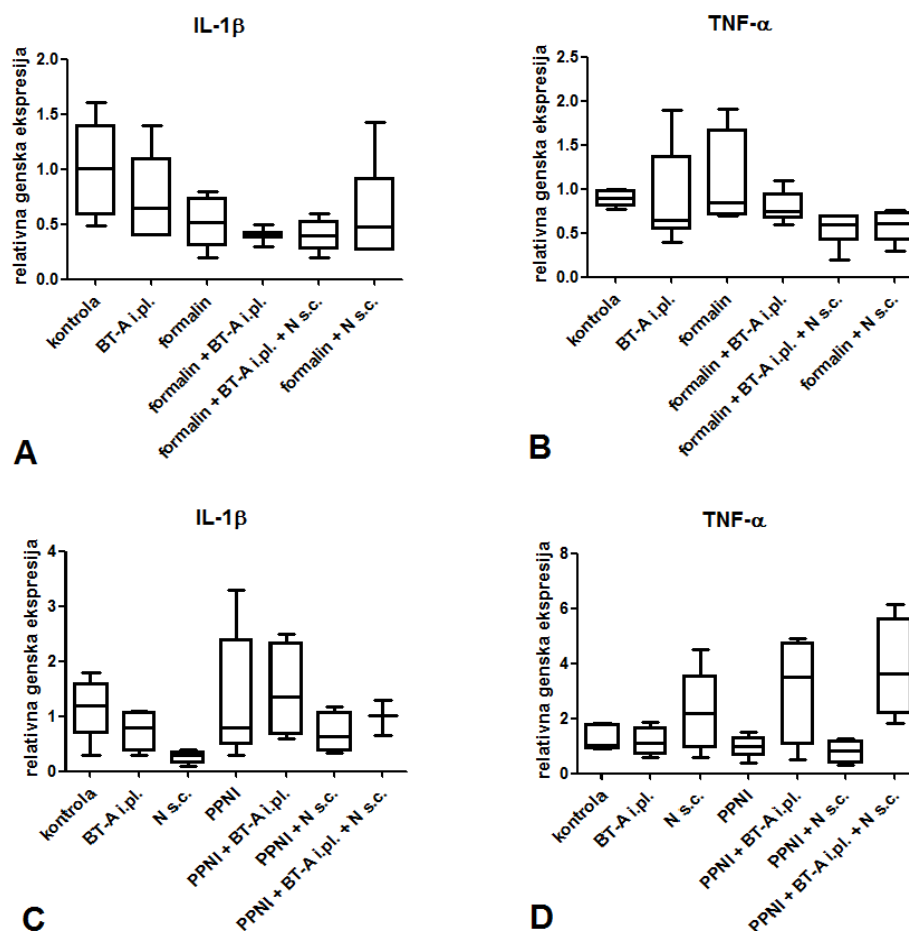
**Slika 17** Kvantitativna analiza ekspresije: A) i B) GFAP imunoreaktivnosti, C) i D) CD11b imunoreaktivnosti; mjereno u ipsilateralnim (A i C) i kontralateralnim (B i D) senzornim laminama prereza L3–L5 kralješnične moždine. Analiza je provedena primjenom *CellDimension* programske podrške sa slika fotografiranih digitalnom kamerom spojenom na epifluorescentni mikroskop. Površina imunoreaktivnosti glija stanica, u kontrole i različitih eksperimentalnih skupina životinja u kojih je bol uzrokovana PPNI, izračunata je prema ručno podešenoj vrijednosti praga pri kojem su se označile glija stanice na označenom području od interesa (engl. region of interest, ROI). Prosječna imunoreaktivnost obilježenih glija stanica za svaku životinju izračunata je iz 3 prereza. Aritmetička sredina  $\pm$  SEM, n=4; A) \*  $P < 0.05$  u odnosu na PPNI i PPNI + N.s.c., \*\*  $P < 0.01$  u odnosu na PPNI + BT-A i.pl., +  $P < 0.05$  u odnosu na PPNI + N s.c., ++  $P < 0.01$  u odnosu na PPNI i PPNI + BT-A i.pl. + N s.c.; B) \*  $P < 0.05$  u odnosu na PPNI + BT-A i.pl. + N s.c., \*\*  $P < 0.01$  u odnosu na kontrolu i PPNI + N s.c.; C) \*\*  $P < 0.01$  u odnosu na PPNI, PPNI + BT-A i.pl. i PPNI + N s.c., +  $P < 0.05$  u odnosu na PPNI + BT-A i.pl., PPNI + N s.c. i PPNI + BT-A i.pl. + N s.c. ##  $P < 0.01$  u odnosu na PPNI + BT-A i.pl. i PPNI + N s.c.; D) \*\*  $P < 0.01$  u odnosu na PPNI, ++  $P < 0.01$  u odnosu na PPNI i PPNI + BT-A i.pl. (Tukey *post hoc*)

#### 4.2.2.1 Ekspresija mRNA proupalnih citokina

Paralelno s proučavanjem potencijalnih učinaka BT-A na aktivaciju glija stanica, analizirali smo i učinke BT-A na dva proupalna citokina uključena u središnju senzitivaciju, TNF $\alpha$  i IL-1 $\beta$ , u modelu formalinom uzrokovane akutne upalne boli (tkivo uzeto 2h nakon injiciranja formalina) te u modelu kronične neuropatske boli uzrokovane PPNI (tkivo uzeto 21 dan nakon PPNI), koristeći qRT-PCR metodu. Ni u jednom modelu nisu bile značajne razlike



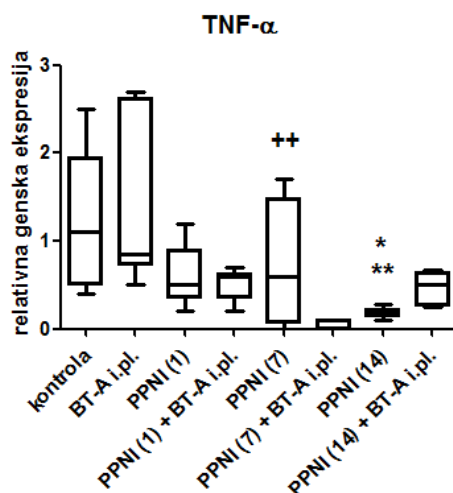
među skupinama u ekspresiji mRNA istraživanih citokina u lumbalnom L3–L5 dijelu leđne moždine (slika 18).



**Slika 18 Ekspresija mRNA proupalnih citokina IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  u: A) i B) formalinskom testu.** qRT-PCR analiza provedena je u uzorcima lumbalnog L3–L5 segmenta kralješnične moždine, uzetim 2h nakon i.pl. injiciranja 5%-tnog formalina. BT-A (5 i.j./kg) je primijenjen i.pl. 5 dana, a opioidni antagonist naltrekson (2 mg/kg s.c.) 40 min prije izvođenja formalinskog testa; C) i D) **Neuropatiji uzrokovanoj PPNI.** qRT-PCR analiza provedena je u uzorcima lumbalnog L3–L5 segmenta kralješnične moždine, uzetim 21 dan nakon izazivanja PPNI. BT-A (7 i.j./kg) je primijenjen i.pl. 14. dan nakon izazivanja PPNI, a opioidni antagonist naltrekson (2 mg/kg s.c.) 7. dan nakon injiciranja BT-A, a 40 min prije izvođenja nocicepcijskih testova. Medijan i interkvartilni raspon, n=5 (Mann-Whitney U test)

S obzirom da je ekspresija proupalnih citokina u različitim eksperimentalnim modelima ovisna o vremenu uzorkovanja te kako u našem modelu nije prethodno istraživana, analizirali smo učinke BT-A na ekspresiju mRNA TNF $\alpha$  u L3–L5 segmentu kralješnične moždine u tri ranije vremenske točke PPNI modela u cilju dodatne provjere dobivenih nalaza. Ekspresija mRNA TNF $\alpha$  nije bila značajno različita kod neuropatskih životinja 1. i 7. dan nakon izazivanja PPNI, dok je nakon 14 dana uočena prilagodba „na niže“ (slika 19). Učinak BT-A na ekspresiju mRNA TNF $\alpha$  bio je različit u sljedećim vremenskim točkama: BT-A, injiciran

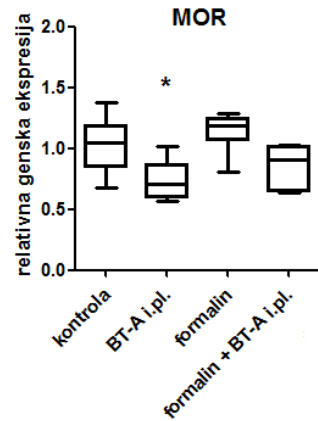
1 dan prije uzrokovanja PPNI nije utjecao na ekspresiju mRNA TNF $\alpha$ , injiciran 2. dan nakon PPNI je smanjio ekspresiju mRNA TNF $\alpha$  u neuropatskih životinja, a injiciran 9. dan je povećao ekspresiju mRNA TNF $\alpha$  u neuropatskih životinja.



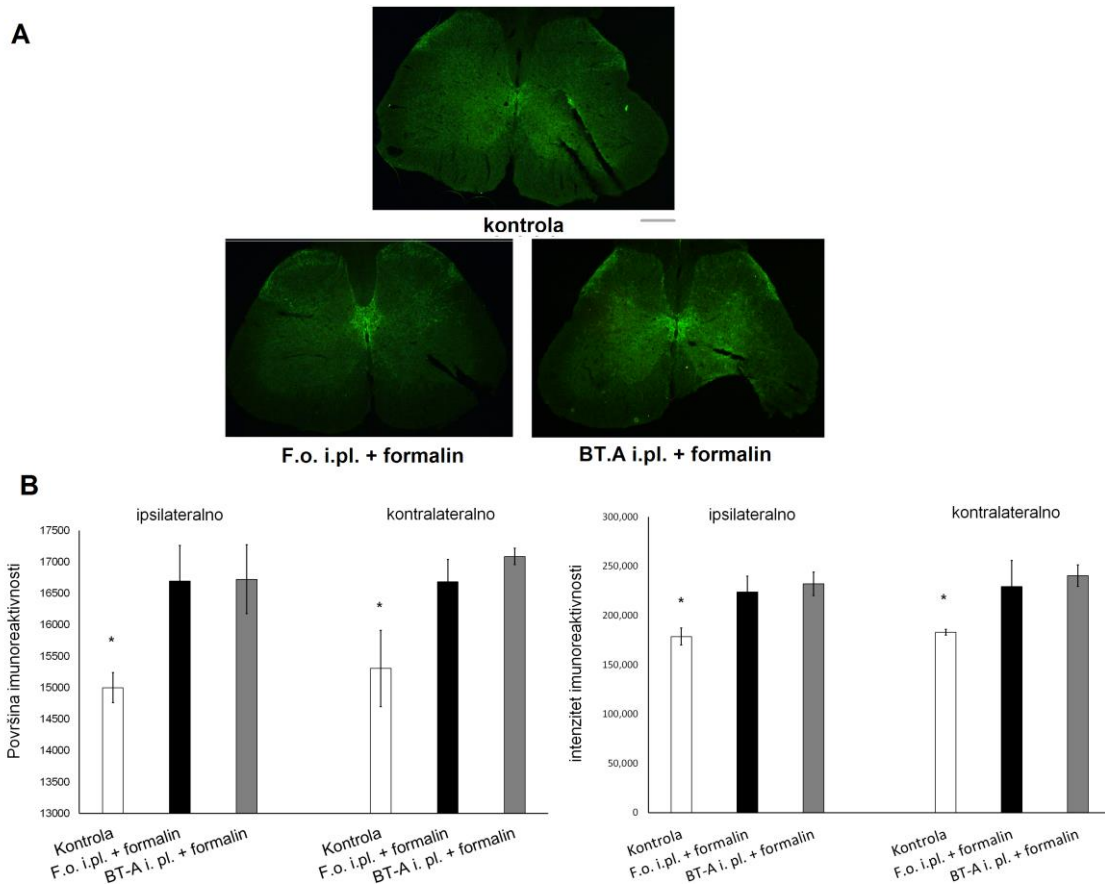
**Slika 19 Utjecaj BT-A na ekspresiju mRNA proupalnog citokina TNF- $\alpha$  u različitim vremenskim točkama PPNI modela.** qRT-PCR analiza provedena je u uzorcima lumbalnog L3–L5 segmenta kralješnične moždine, uzetim 1., 7. i 14. dan nakon izazivanja PPNI. BT-A (7 i.j./kg) je primijenjen i.pl. 5 dana prije, 1 dan nakon ili 9 dana nakon izazivanja PPNI. Medijan i interkvartilni raspon, n=6, \* P<0.05 u odnosu na PPNI (14) + BT-A i.pl., \*\* P<0.01 u odnosu na kontrolu (14), ++ P<0.01 u odnosu na PPNI (7) + BT-A i.pl. (Mann-Whitney U test)

#### 4.2.3 Učinak BT-A na ekspresiju Leu/Met-enkefalina i mRNA $\mu$ -opioidnih receptora

Kvantitativnom RT-PCR analizom mRNA  $\mu$ -opioidnih receptora u uzorcima L3–L5 segmenta kralješnične moždine životinja u kojima je upalna bol uzrokovana i.pl. formalinom, nismo dobili statistički značajne razlike između različitih eksperimentalnih skupina u odnosu na kontrolnu ekspresiju mRNA  $\mu$ -opioidnih receptora (slika 20). Međutim, skupina životinja tretirana samo i.pl. BT-A (5 i.j./kg) (bez izazvane boli) imala je smanjenu ekspresiju mRNA  $\mu$ -opioidnih receptora u odnosu na kontrolne životinje. Metodom imunohistokemije ispitana je i proteinska ekspresija Leu/Met-enkefalina. Najveća distribucija enkefalina nađena je u površinskim laminama I i II dorzalnog roga te u lamini X oko centralnog kanala (slika 21 i 22), što odgovara distribuciji enkefalina prethodno opisanoj u literaturi (Fukushima i sur., 2011.). Površina i intenzitet imunoreaktivnosti kod životinja s upalnom (P<0.05) i neuropatskom (P<0.01) boli bio je statistički značajno veći u odnosu na kontrolu (slika 21 i 22). Blagi porast površine i intenziteta imunoreaktivnosti, no statistički neznačajan, bio je prisutan na ipsilateralnoj strani dorzalnog roga skupine životinja s PPNI tretiranih BT-A (slika 22).

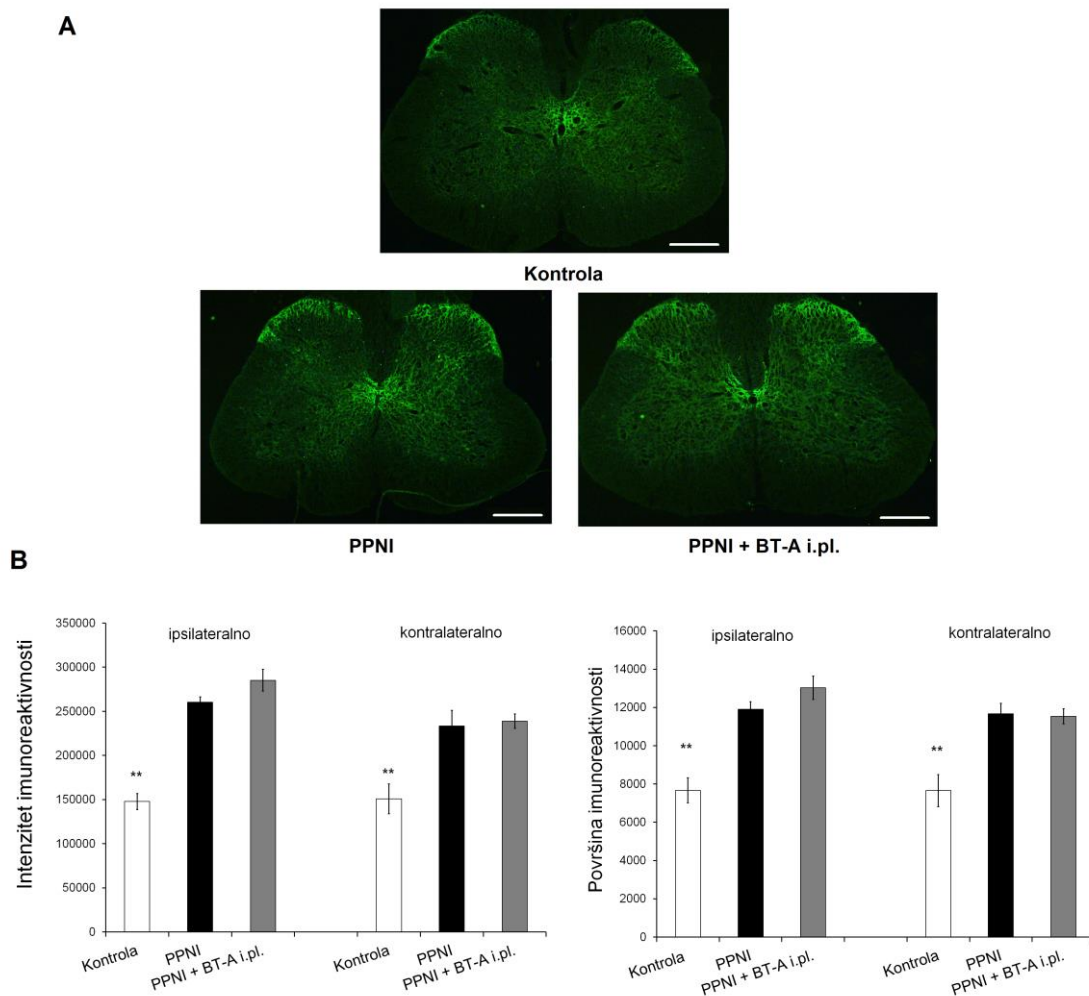


**Slika 20 Utjecaj BT-A na ekspresiju mRNA  $\mu$ -opioidnih receptora u lumbalnom L3–L5 segmentu kralješnične moždine netretiranih životinja i životinja s upalnom boli uzrokovanom i.pl. primjenom 5%-tnog formalina.** BT-A (5 i.j./kg) je primijenjen i.pl. 5 dana prije uzorkovanja. Ekspresija mRNA  $\mu$ -opioidnih receptora analizirana je qRT-PCR metodom; MOR=  $\mu$ -opioidni receptor. Medijan i interkvartilni raspon, n=6, \* P<0.05 u odnosu na kontrolu (Mann-Whitney U test)



**Slika 21 A) Prikaz imunoreaktivnosti Leu/Met-enkefalina u poprečnom prerezu L4 segmenta kralješnične moždine životinja s eksperimentalnom upalnom boli.** Leu/Met-enkefalin obojen je zeleno. Reprezentativni primjeri 20x uvećanih fotografija pojedinih eksperimentalnih skupina, slikanih digitalnom kamerom spojenom na mikroskop. Mjerilo (linije na fotografijama prereza): 200  $\mu$ m. **B) Kvantitativna analiza površine i intenziteta imunoreaktivnosti Leu/Met-enkefalina u senzornim laminama L4 prereza kralješnične moždine.** Analiza je provedena primjenom *ImageJ* programske podrške sa slika fotografiranih digitalnom kamerom spojenom na epifluorescentni mikroskop. Prosječna imunoreaktivnost za svaku životinju izračunata je iz 3 prereza. Aritmetička sredina  $\pm$  SEM, n=4, \* P<0.05 (Tukey *post hoc*)





**Slika 22 A) Prikaz imunoreaktivnosti Leu/Met-enkefalina u poprečnom prerezu L4 segmenta kralješnične moždine životinja s eksperimentalnom neuropatskom boli.** Leu/Met-enkefalin obojen je zeleno. Reprezentativni primjeri 20x uvećanih fotografija pojedinih eksperimentalnih skupina, slikanih digitalnom kamerom spojenom na mikroskop. Mjerilo (linije na fotografijama prereza): 200  $\mu$ m. **B) Kvantitativna analiza površine i intenziteta imunoreaktivnosti Leu/Met-enkefalina u senzornim laminama L4 prereza kralješnične moždine.** Analiza je provedena primjenom *ImageJ* programske podrške sa slika fotografiranih digitalnom kamerom spojenom na epifluorescentni mikroskop. Prosječna imunoreaktivnost izračunata je iz 3 prereza. Aritmetička sredina  $\pm$  SEM, n=4, \* P<0.05 (Tukey *post hoc*)

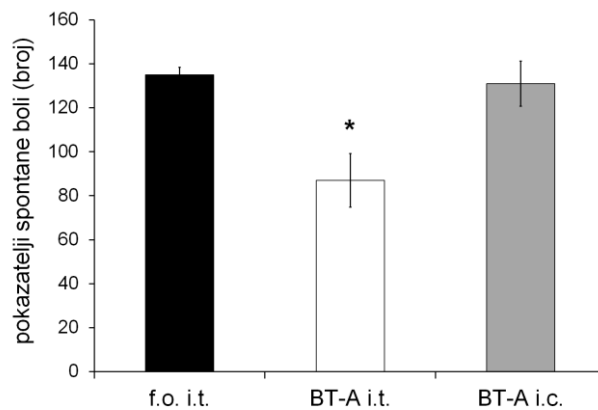
### **4.3 Mjesto središnjeg antinociceptivnog djelovanja BT-A: segmentalni učinak na spinalnoj razini**

Do sada je pokazano da BT-A (3.5–7 i.j./kg) nakon periferne primjene, supkutano u plantarnu površinu stražnje šape ili u područje brkova, smanjuje različite vrste eksperimentalne boli s nastupom antinociceptivnog učinka nakon 3–5 dana. Također je pokazano da manja doza BT-A (1 i.j./kg) nakon izravne primjene u spinalni kanal smanjuje upalnu bol uzrokovanu formalinom i dijabetičku neuropatiju uzrokovanu streptozotocinom već nakon 24 sata. Učinkovitost nekoliko puta niže doze te brz nastup djelovanja nakon središnje primjene među prvim su eksperimentalnim dokazima koji su ukazali na središnje mjesto antinociceptivnog djelovanja BT-A. Međutim, do sada nisu istraživani učinci BT-A nakon primjene u *cisternu magnu* ili moždane komore čime bi se moguće uključile i supraspinalne strukture u antinociceptivno djelovanje BT-A. Stoga je cilj ovih pokusa bio istražiti razine/mjesta na kojima BT-A ostvaruje antinociceptivni učinak u modelima: a) slabo lokalizirane visceralne boli (eksperimentalni peritonitis i kolitis), b) bilateralne boli uzrokovane unilateralnom ozljedom (injiciranjem  $\lambda$ -karagenana u *m. gastrocnemius*), c) formalinskom testu i d) orofacijalnom formalinskom testu. Bihevioralne rezultate provjerili smo analizom cSNAP-25 imunoreaktivnosti u tkivu mozga i produžene moždine nakon i.c. i i.c.v. primjene.

#### **4.3.1 Visceralna bol**

##### ***4.3.1.1 Peritonitis uzrokovan i.p. octenom kiselinom***

Primjena 1%-tne octene kiseline u peritoneum (i.p.) uzrokovala je abdominalne grčeve, stereotipni odgovor u obliku kontrakcija abdominalnog mišićja, uvijanja i zakretanja trupa te istežanja stražnjih udova. Bol je kvantificirana brojanjem grčeva u trajanju od 60 min. U ovom se modelu istraživalo djelovanje BT-A na slabo lokaliziranu visceralnu bol i to nakon jednokratne primjene 5 dana prije mjerenja, na mjesto uzrokovanja boli (u peritoneum, i.p.), u spinalni kanal (i.t.) i supraspinalno u *cisternu magnu* (i.c.). Primjena BT-A (2 i.j./kg) u spinalni kanal smanjila je broj abdominalnih grčeva ( $P < 0.05$ ), dok je kod primjene iste doze u *cisternu magnu* antinociceptivni učinak izostao (slika 23). Primjena visoke doze BT-A (15 i.j./kg) u peritoneum uzrokovala je sistemsku slabost životinja zbog čega su izostali abdominalni grčevi nakon primjene octene kiseline te su daljnja mjerenja bila onemogućena.



**Slika 23 Intratekalno primijenjen BT-A (2 i.j./kg) smanjuje visceralnu bol uzrokovanu 1%-tnom octenom kiselinom.** BT-A je primijenjen i.t. ili i.c. 5 dana prije uzrokovanja boli i.p. octenom kiselinom (1%). Aritmetička sredina  $\pm$  SEM, n=6, \*  $P < 0.05$  u odnosu na kontrolu (Tukey *post hoc*)

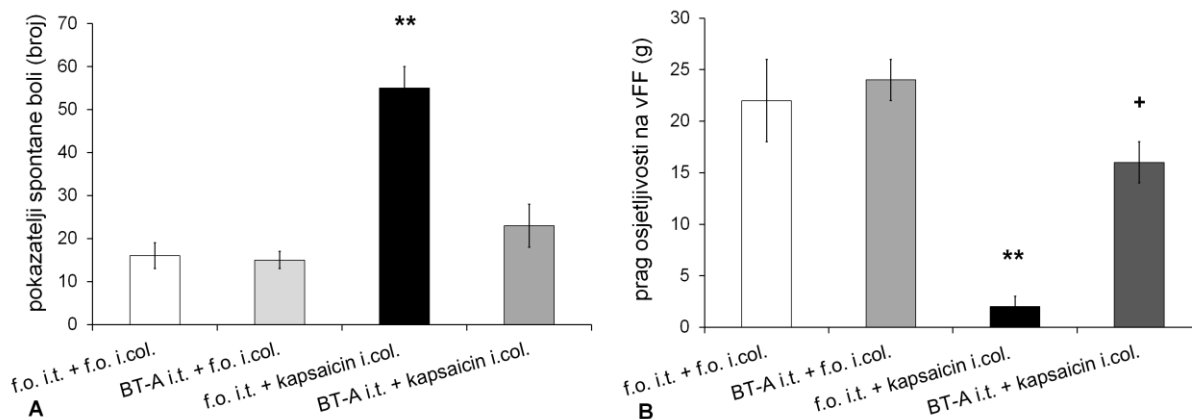
#### 4.3.1.2 *Kolitis i prenesena hiperalgezija uzrokovana i.col. kapsaicinom*

Za razliku od prethodnog modela visceralne boli u kojem je bolno ponašanje posljedica iritacije organa smještenih u peritonealnoj šupljini, u ovom modelu je ispitan antinociceptivni učinak BT-A na specifičnu bol porijeklom iz kolona.

I.col. instilacija 0.1%-tnog kapsaicina (100  $\mu$ L) uzrokovala je spontano bolno ponašanje, slično abdominalnim grčevima, u trajanju od 20 min. Kontrolnim je životinjama injiciran isti volumen fiziološke otopine. Za razliku od kapsaicina, instilacija fiziološke otopine u kolon uzrokovala je mali broj abdominalnih kontrakcija, koje su vjerojatno bile povezane s rastezanjem kolona zbog primijenjenog volumena (slika 24a). I.t. primjena BT-A (2 i.j./kg) 2 dana prije mjerenja nije utjecala na abdominalne kontrakcije izazvane f.o., ali je značajno smanjila broj kontrakcija uzrokovanih kapsaicinom ( $P < 0.01$ ).

Za razliku od fiziološke otopine, i.col. kapsaicin je nakon 20 min spontane boli uzrokovao i sekundarnu mehaničku alodiniju na području abdomena, što je mjereno von Freyjevimi filamentima (slika 24b). Ovu prenesenu bol, koja je svojstvena boli porijeklom iz visceralnih organa, i.t. BT-A je značajno smanjio ( $P < 0.01$ ).

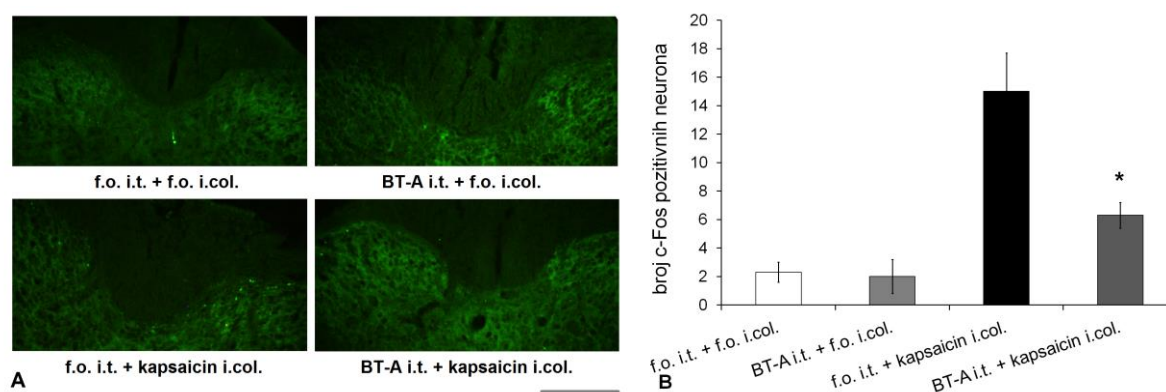
Suprotno središnjoj primjeni, BT-A (10 i.j./kg) primijenjen periferno u kolon, nije djelovao ni na spontanu niti na prenesenu bol (vrijednosti f.o. i.col. vs. BT-A i.col. za broj abdominalnih grčeva  $90 \pm 5$  vs.  $88 \pm 5$ , a za prenesenu hiperalgeziju  $4.4 \pm 1$  vs.  $4 \pm 1$ ).



**Slika 24 Intratekalno primijenjen BT-A smanjuje visceralnu bol uzrokovanu instilacijom 0.1%-tnog kapsaicina u kolon.** Učinak BT-A (2 i.j./kg i.t.) na **A) spontanu bol.** Aritmetička sredina  $\pm$  SEM,  $n=6$ ; \*\*  $P<0.01$  u odnosu na f.o. i.t. + f.o. i.col., BT-A i.t. + f.o. i.col. i BT-A i.t. + kapsaicin i.c. (Tukey *post hoc*) i **B) prenesenu bol.** Aritmetička sredina  $\pm$  SEM,  $n=6$ ; +  $P<0.05$  u odnosu na f.o. i.t. + f.o. i.col., BT-A i.t. + f.o. i.col., \*\*  $P<0.01$  u odnosu na f.o. i.t. + f.o. i.col., BT-A i.t. + f.o. i.col. i BT-A i.t. + kapsaicin i.c. (Tukey *post hoc*).

#### 4.3.1.3 Imunoreaktivnost c-Fos proteina u dorzalnom rogu kralješnične moždine

Imunoreaktivnost proteina c-Fos istražena je u lumbosakralnom segmentu (L6–S2) kralješnične moždine životinja u modelu kapsaicinom-uzrokovanog kolitisa. Većina c-Fos pozitivnih neurona bila je smještena u površinskim laminama (slika 25). Rezultati bihevioralnih pokusa potvrđeni su rezultatima kvalitativne i kvantitativne analize neuronalne aktivacije. I.t. BT-A statistički je značajno smanjio broj c-Fos pozitivnih stanica u sakralnom S2/S3 segmentu ( $P<0.05$ ).

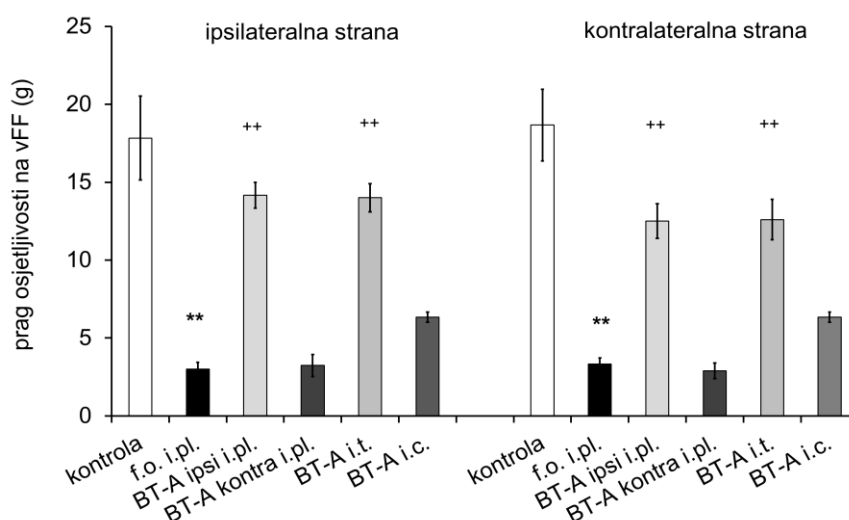


**Slika 25 A) Ekspresija imunofluorescentno obilježeni c-Fos proteina (zeleni) u površinskim laminama prereza sakralnog S2/S3 segmenta kralješnične moždine.** Reprezentativni primjeri 10x uvećanih fotografija pojedinih eksperimentalnih skupina, slikanih digitalnom kamerom spojenom na mikroskop. Mjerilo (linija ispod fotografije prereza): 200  $\mu$ m. **B) Kvantitativna analiza c-Fos ekspresije u laminama I i II, s 10x uvećanih fotografija.** Ukupan broj c-Fos pozitivnih neurona u površinskim senzornim laminama kralješnične moždine. Prosječan broj c-Fos pozitivnih neurona za svaku životinju izračunat je iz 3 prereza. Aritmetička sredina  $\pm$  SEM,  $n=4$ , \*  $P<0.01$  u odnosu na f.o. i.t. + kapsaicin i.col. (Tukey *post hoc*)

Prikazani rezultati dobiveni na modelu visceralne boli (slike 23–25) objavljeni su u znanstvenom radu: Drinovac V, Bach-Rojecky L, Babić A, Lacković Z (2014) Antinociceptive effect of botulinum toxin type A on experimental abdominal pain. *Eur J Pharmacol* **745**: 190-195.

#### 4.3.2 Bilateralna bol uzrokovana unilateralnom ozljedom

Nastanak boli kontralateralno u odnosu na stranu uzrokovanja ozljede specifičan je fenomen središnjeg porijekla. Prethodno je na modelu bilateralne boli uzrokovane dvostrukim i.m. injiciranjem fiziološke otopine pH 4,0 pokazano da BT-A ima bilateralni antinociceptivni učinak nakon unilateralne primjene koji je posredovan aksonalnim transportom u SŽS (Bach-Rojecky i Lacković, 2009.). U ovom je pokusu cilj bio ispitati učinke BT-A nakon različitih načina primjene na bilateralnu bol uzrokovanu i.m. injiciranjem 100  $\mu$ L  $\lambda$ -karagenana.



**Slika 26** Učinak BT-A na bilateralnu bol uzrokovanu unilateralnom i.m. primjenom  $\lambda$ -karagenana. BT-A (5 i.j./kg) je injiciran periferno, i.pl. u desnu (ipsilateralno) ili lijevu (kontralateralno) stražnju šapu te središnje, i.t. ili i.c. (1 i.j./kg) životinjama koje su razvile bilateralnu bol 14 dana nakon injiciranja  $\lambda$ -karagenana u desni *m. gastrocnemius*. Mehanička osjetljivost mjerena je na objema šapama primjenom vFF. Prikazani su rezultati mjerenja 5 dana nakon periferne primjene BT-A te 1 dan nakon središnje primjene. Kontrola = životinje tretirane i.m. fiziološkom otopinom, ostale skupine = životinje tretirane i.m. karagenanom. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina  $\pm$  SEM, n=6, \*\* P<0.01 u odnosu na kontrolu; ++ P<0.01 u odnosu na f.o. i.pl. (Tukey *post hoc*)

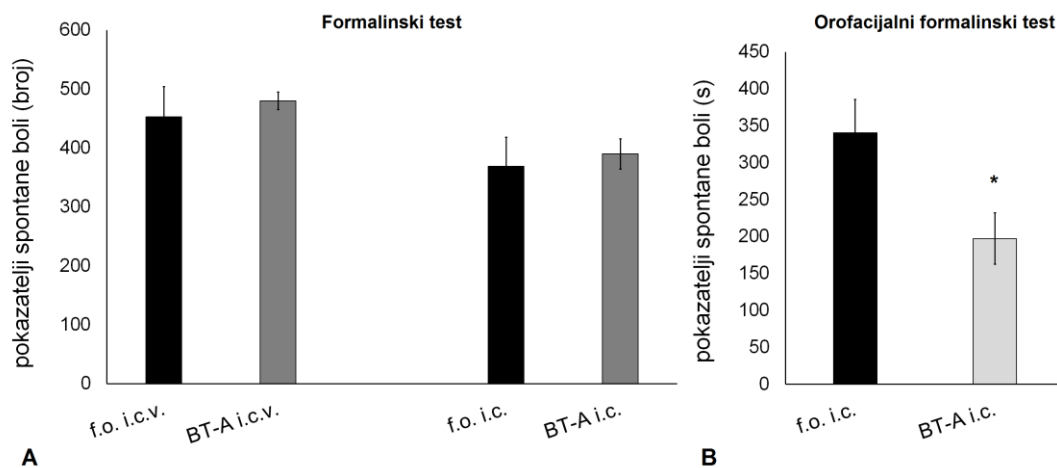
Injiciranje 100  $\mu$ L 3%-tne otopine  $\lambda$ -karagenana u desni *m. gastrocnemius* štakora uzrokovalo je obostrano povećanu osjetljivost na mehanički podražaj tkiva stražnjih šapa (sekundarnu mehaničku alodiniju) u oko 80% životinja nakon 2 tjedna. Prag mehaničkog podražaja, mjereno vFF, bio je obostrano značajno niži u odnosu na kontrolnu skupinu, koja je i.m. injicirana fiziološkom otopinom (P<0.01). BT-A (5 i.j./kg), primijenjen u plantarnu površinu

desne stražnje šape (ipsilateralno) životinjama s razvijenom bilateralnom boli, smanjio je preosjetljivost na obje strane ( $P < 0.01$ ) nakon 5 dana. Suprotno tomu, primijenjen u plantarnu površinu lijeve stražnje šape (kontralateralno) nije djelovao ni na jednoj strani (slika 26). Obostrano smanjenje mehaničke preosjetljivosti ( $P < 0.01$ ) uočeno je i 1 dan nakon primjene BT-A u spinalni kanal, dok nakon primjene u cerebelomedularnu cisternu nije djelovao čak ni nakon 5 dana (slika 26).

#### 4.3.3 Supraspinalno primijenjen BT-A ne smanjuje bol nakon injiciranja formalina u šapu, ali smanjuje bol nakon injiciranja formalina u orofacijalno područje

Formalinski test, bilo na području šape ili na orofacijalnom području, jedan je od najčešće korištenih modela boli u istraživanju. Osim toga, antinociceptivno djelovanje periferno primijenjenog BT-A, kao i intratekalnog i intraganglijskog, ispitano je i potvrđeno u više različitih studija i na različitim vrstama životinja. No, učinci nakon supraspinalne primjene nisu dovoljno istraženi. Stoga smo navedene testove koristili kako bismo dodatno ispitali prethodno dobivene nalaze na dosad neistraženim modelima.

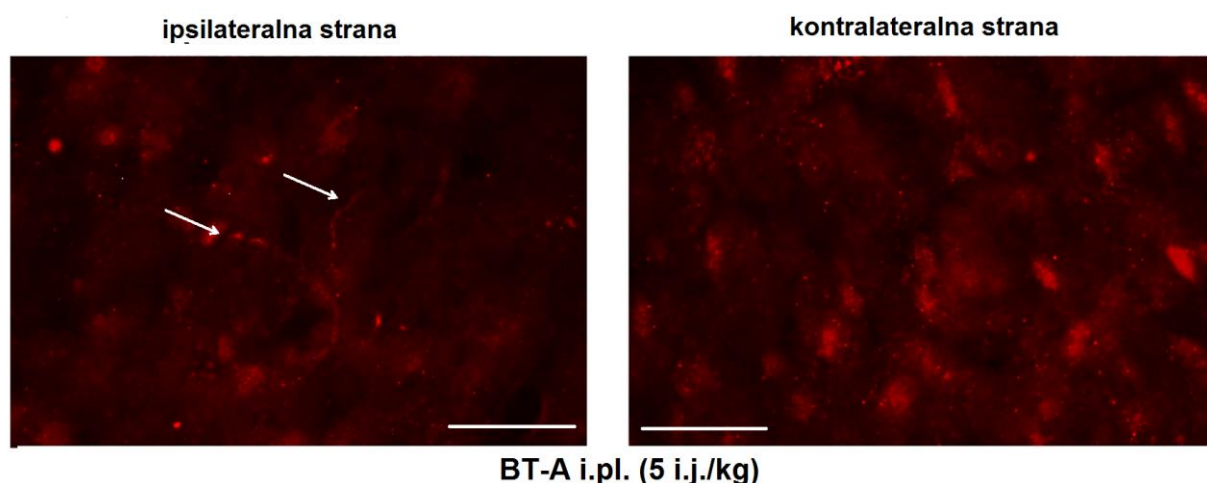
BT-A (1 i.j./kg), primijenjen i.c. ili i.c.v. 3 dana prije formalinskog testa, nije djelovao na drugu fazu formalinskog testa (slika 27a). S druge strane, primijenjen i.c. 3 dana prije orofacijalnog formalinskog testa smanjio je bol u drugoj fazi testa ( $P < 0.05$ , slika 27b).



**Slika 27 A) Izostanak antinociceptivnog djelovanja BT-A nakon i.c. i i.c.v. primjene u drugoj fazi formalinskog testa.** Mjerenje je izvedeno 3 dana nakon i.c. ili i.c.v. injekcije BT-A (1 i.j./kg). Bol je mjerena kao broj lizanja i trzaja šape injicirane 5 %-tnim formalinom. **B) BT-A primijenjen i.c. smanjuje bol u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa.** BT-A (1 i.j./kg) je injiciran 3 dana prije testa. Bol je mjerena kao vrijeme trljanja područja brkova nakon injiciranja 2.5 %-tnog formalina u njušku. Aritmetička sredina  $\pm$  SEM,  $n=5-6$ ; \*  $P < 0.05$  u odnosu na f.o. i.c. (Tukey *post hoc*)

#### 4.3.4 Enzimaska aktivnost BT-A u SŽS-u nakon i.pl., i.c. i i.c.v. primjene BT-A

U modelu bilateralne mišićne hiperalgezije uzrokovane i.m. karagenanom ispitali smo prisutnost c1SNAP-25 u uzorcima lumbalnog L3–L5 segmenta kralješnične moždine nakon jednostrane i.pl. primjene BT-A (5 i.j./kg). Imunoreaktivnost pocijepanog SNAP-25 proteina pojavila se u ipsilateralnim ventralnim rogovima kralješnične moždine, lokalizirana kako je prethodno već pokazano nakon istog načina primjene veće doze (15 i.j./kg) (Matak i sur., 2012.). Ovdje smo uočili barem 2 mala pojedinačna vlakna u ipsilateralnom dorzalnom rogu lumbalnog L4 segmenta (Slika 28), koja su u većini prereza bila smještena u dubljim laminama III i IV. U kontralateralnom dorzalnom rogu nije uočena c1SNAP-25 imunoreaktivnost (slika 28).

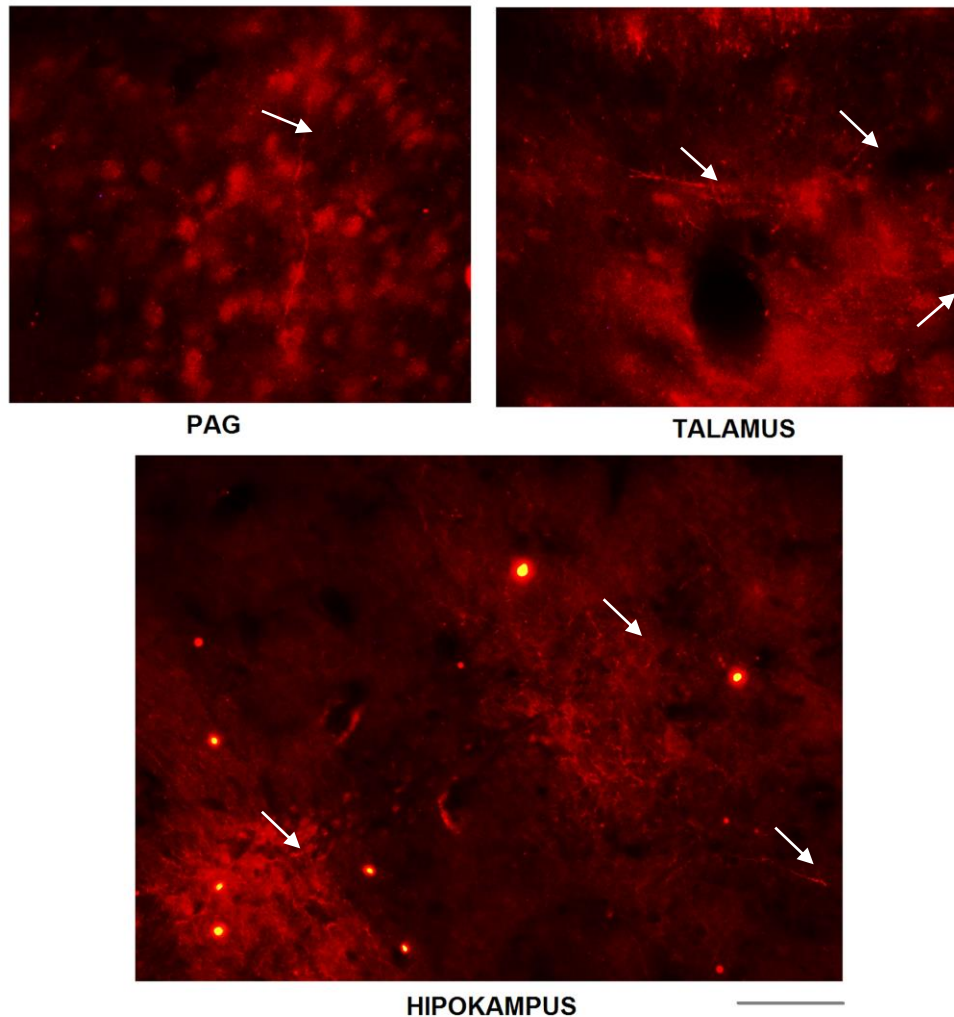


**Slika 28** Proteolitička aktivnost BT-A u dorzalnom rogu nakon jednostrane i.pl. primjene prisutna samo na strani primjene BT-A (5 i.j./kg). Reprezentativni primjeri 40x uvećanih fotografija slikanih digitalnom kamerom spojenom na mikroskop. Crveno obojena vlakna predstavljaju imunoreaktivnost c1SNAP-25 (označeno bijelim strelicama) i tipično je lokalizirana u lamini III. N (broj životinja) = 4 (8 prereza je analizirano po životinji). Mjerilo (linije na fotografijama prereza): 20  $\mu$ m

Kako u prethodno spomenutim modelima boli BT-A primijenjen supraspinalno nije ostvario antinociceptivno djelovanje, te kako ne postoje literaturni podaci o distribuciji BT-A nakon supraspinalne primjene, provjerili smo ima li BT-A nakon primjene u *cisternu magnu* i moždane komore proteolitičku aktivnost, te gdje je ona distribuirana. Imunoreaktivnost pocijepanog SNAP-25 proteina analizirana je u uzorcima mozga i produžene moždine uzetih 3 dana nakon i.c. ili i.c.v. primjene BT-A (5 i.j./kg). Nakon primjene u moždane komore, najveća je distribucija BT-A uočena u hipokampusu, zatim u regijama mozga smještenim neposredno uz moždane komore i talamusu (slika 29). Nekoliko je pojedinačnih vlakana uočeno u području PAG-a, dok u regijama ispod PAG-a te dijelovima produžene moždine i

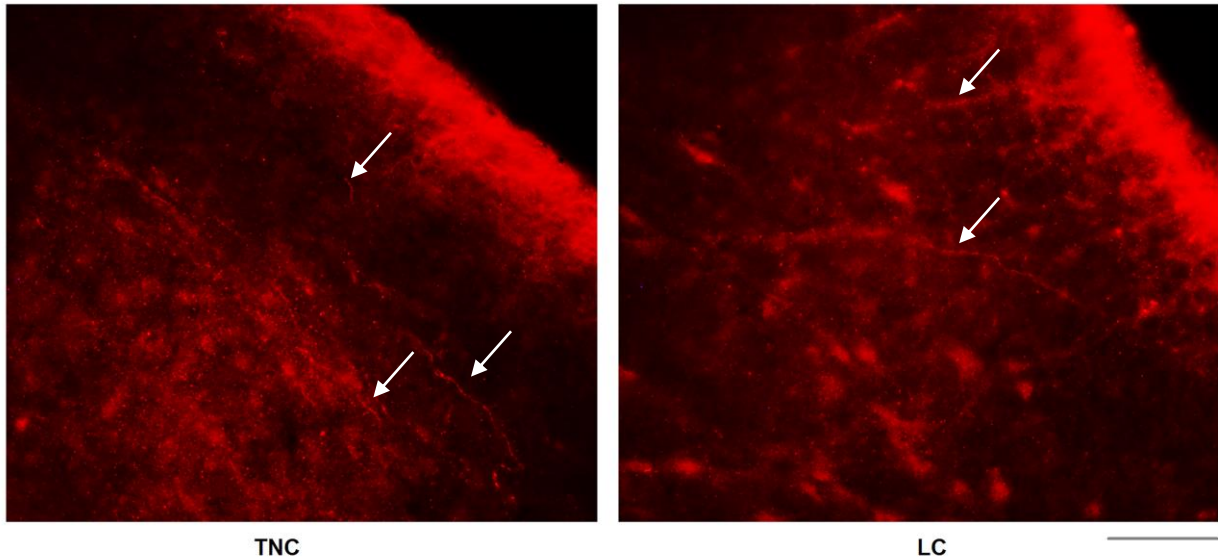


cervikalnog dijela leđne moždine nismo uočili cISNAP-25 imunoreaktivnost. Nakon primjene u *cisternu magnu*, cISNAP-25 imunoreaktivnost pronađena je većinom u površinskim dijelovima TNC-a (slika 30), dok su se pojedinačna imunoreaktivna vlakna mogla uočiti i u LC-u (slika 30), dok u PAG-u te udaljenijim regijama mozga cISNAP-25 nije uočen.



**Slika 29 Distribucija BT-A (5 i.j./kg) 5 dana nakon primjene u moždane komore.** Imunofluorescencija cISNAP-25 proteina (crveno obojana vlakna označena bijelim strelicama) prisutna u regijama mozga, uključenima u nocicepciju: PAG (siva tvar oko akvedukta), talamus i hipokampus. Reprezentativni primjeri 40x uvećanih fotografija slikanih digitalnom kamerom spojenom na mikroskop. N (broj životinja) = 4 (8 prereza je analizirano po životinji). Mjerilo (linija ispod fotografije hipokampusa): 20  $\mu$ m.





**Slika 30 Distribucija BT-A (5 i.j./kg) 5 dana nakon primjene u *cisternu magnu*.** Imunofluorescencija cISNAP-25 proteina (crveno obojana vlakna označena bijelim strelicama) prisutna u produženoj moždini (TNC) i LC. Reprezentativni primjeri 40x uvećanih fotografija slikanih digitalnom kamerom spojenom na mikroskop. N (broj životinja) = 4 (8 prereza je analizirano po životinji). Mjerilo (linija ispod LC fotografije): 20  $\mu$ m.

*Prikazani rezultati (slika 28) dobiveni na modelu bilateralne mišićne hiperalgezije objavljeni su u radu: Drinovac Vlah V, Bach-Rojecky L, Lacković Z (2016) Antinociceptive action of botulinum toxin type A in carrageenan-induced mirror pain. J Neural Transm (Vienna) 123(12): 1403-1413.*

## **5 RASPRAVA**

## 5.1 Periferno primijenjen BT-A aktivira inhibicijske neurotransmitske sustave na spinalnoj razini

Istraživanja s kolhicinom, inhibitorom aksonalnog transporta, pokazala su da je antinociceptivno djelovanje periferno primijenjenog BT-A posljedica njegovog aksonalnog transporta u SŽS i enzimske aktivnosti u dorzalnog rogu kralješnične moždine, odnosno TNC (Bach-Rojecky i Lacković, 2009.; Matak i sur., 2011., 2012.; Filipović i sur., 2012.). Za sada nije u potpunosti poznato do kojih senzornih područja SŽS-a BT-A dolazi aksonalnim transportom s periferije, odnosno podliježe li i prijelazu u neurone drugog reda ili glija stanice (transcitozi), no moglo bi biti važno u rasvjetljavanju mehanizma djelovanja BT-A na patološku bolnu preosjetljivost. Prema istraživanjima iz našeg laboratorija čini se da periferno primijenjen BT-A ostaje lokaliziran u središnjim završecima primarnih aferentnih neurona, s obzirom da cSNAP-25 imunoreaktivnost nije pronađena u udaljenim supraspinalnim regijama mozga nakon s.c. primjene BT-A u područje njuške štakora, niti postoji kolokalizacija s GFAP, markerom astrocita, u TNC-u (Matak i sur., 2011.; Matak, Doktorski rad, 2015.). No, kako je prethodno spomenuto, prisutnost cSNAP-25 u *duri mater* nakon periferne primjene BT-A (Lacković i sur., 2016.) ne može se objasniti bez transcitoze u trigeminalna vlakna koja inerviraju duru. Neki autori predlažu mogućnost transcitoze BT-A unutar trigeminalnog ganglija (Kitamura i sur., 2009.; Shimizu i sur., 2012.), što bi ukupno objasnilo sve navedene nalaze.

U nedostatku uvjerljivih dokaza o mogućoj transcitozi u senzornim neuronima, barem na razini dorzalnog roga ili TNC-a, dosadašnji rezultati sugeriraju da BT-A djeluje iz središnjih završetaka primarnih aferentnih vlakana inhibicijom lučenja neurotransmitora i neuropeptida uključenih u proces nocicepcije. Selektivno smanjenje bolne preosjetljivosti bez utjecaja na normalan prag osjetljivosti i akutni bolni podražaj upućuje da bi se aksonalni transport BT-A mogao odvijati određenim vrstama neurona; npr. C vlaknima, s obzirom da se njihovom ponavljanoj stimulacijom inducira „*wind-up*“ fenomen i nastanak središnje senzitivacije, dok A $\delta$  vlakna sudjeluju u prijenosu akutne, brze boli. Nedavno je pokazano da selektivnim uništenjem trigeminalnih neurona koji eksprimiraju TRPV1 receptor intraganglijskom primjenom kapsaicina izostaje antinociceptivno djelovanje BT-A i cSNAP-25 imunoreaktivnost u TNC-u (Matak i sur., 2014.), čime je sugeriran selektivni aksonalni transport BT-A kroz TRPV1-pozitivna vlakna. Ovaj je nalaz zanimljiv, jer su TRPV1 receptori predominantno eksprimirani na peptidergičkim C vlaknima, iz kojih se luče

neuropeptidi CGRP i SP, te čine 30–50% svih somatoseznornih neurona senzornih ganglija kod glodavaca (Julius, 2013.).

S obzirom da je bolna preosjetljivost, posebno ona sekundarna i proširena izvan mjesta ozljede, posljedica fenomena središnje senzitivacije u koji su uključeni brojni procesi, pa tako i oni koji dovode do slabljenja inhibicijskih utjecaja u dorzalnog rogu, pretpostavili smo da mehanizam antinociceptivnog djelovanja uključuje i potencijalne neuronalne petlje u kojima BT-A izravno ili neizravno ulazi u interakcije s inhibicijskim neurotransmitskim sustavima: opioidnim i GABA-ergičkim.

### 5.1.1 Opioidni sustav

Nekoliko prethodnih istraživanja (Auguet i sur., 2008.; Vacca i sur., 2012.) pokazala su sinergističko antinociceptivno djelovanje neučinkovitih doza BT-A i morfina u modelima karagenanom i formalinom uzrokovane upalne boli. Rezultati ovih ispitivanja posredno upućuju na moguću povezanost antinociceptivnog djelovanja BT-A s endogenim opioidnim sustavom, što se potencijalno čini klinički važnim, s obzirom da endogeni opioidni sustav i endogeni opioidni peptidi imaju glavnu ulogu u kontroli nocicepcije te su jedan od najviše istraženih urođenih analgezijskih sustava (Holden i sur., 2005.). U našim smo pokusima stoga ispitali i karakterizirali učinke neselektivnog antagonista opioidnih receptora naltreksona i selektivnog  $\mu$ -opioidnog antagonista naloksonazina na antinociceptivno djelovanje BT-A u tri različite vrste boli. Budući da je analgetski učinak opioidnih agonista u najvećoj mjeri posredovan  $\mu$ -opioidnim receptorima, željeli smo usporediti učinak neselektivnog antagonista naltreksona s učinkom selektivnog antagonista  $\mu$ -opioidnih receptora. Naltrekson (2 mg/kg s.c.), kao i selektivni  $\mu$ -antagonist naloksonazin (5 mg/kg i.p.), poništili su antinociceptivno djelovanje periferno primijenjenog BT-A u drugoj fazi formalinskog testa (slike 7 i 9). Iako je selektivni  $\mu$ -opioidni antagonist potpuno poništio učinak BT-A, ne možemo u potpunosti isključiti i  $\kappa$  i  $\delta$  opioidne receptore, s obzirom da nismo ispitivali učinak antagonista ostalih opioidnih receptora. Primjena sistemski neučinkovite doze naltreksona izravno u SŽS (7  $\mu$ g/10  $\mu$ L i.t.) poništila je antinociceptivno djelovanje periferno primijenjenog BT-A (slika 7), što potvrđuje središnje mjesto djelovanja BT-A i identificira endogeni opioidni sustav kao važan neurotransmitski sustav koji je uključen u antinociceptivno djelovanje periferno primijenjenog BT-A *in vivo*.

Iako su opioidni antagonisti često korišteni u istraživanjima potencijalne aktivacije endogenog opioidnog sustava u različitim vrstama boli, utjecaj na nocicepciju je u većini

slučajeva ovisan o dozi i načinu primjene antagonista (Kocher, 1988.; Wu i sur., 2002.). Kako bismo isključili mogućnost da opioidni antagonisti mijenjaju bolnu osjetljivost mehanizmom neovisnim o učinku BT-A, ispitali smo učinak BT-A u kombinaciji s različitim dozama opioidnog antagonista. Dok korištene doze naltreksona same nisu imale učinka na formalinom uzrokovanu bol, iste su doze uzrokovale u različitoj mjeri, a ovisno o dozi, blokadu antinociceptivnog djelovanja BT-A (slika 8).

Osim u upalnoj boli, naltrekson (2 mg/kg, s.c.) je značajno smanjio učinak BT-A na mehaničku osjetljivost, kao i na hladnu alodiniju (slika 10) u životinja s neuropatskom boli uzrokovanom PPNI. Također, pokazali smo da bilateralni antinociceptivni učinak BT-A u modelu bilateralne boli uzrokovane i.m. injiciranjem karagenana također uključuje interakciju s endogenim opioidnim sustavom: selektivni  $\mu$ -antagonist (1.5  $\mu$ g/ 10  $\mu$ L) primijenjen i.t. poništio je antinociceptivno djelovanje i.pl. injiciranog BT-A obostrano (slika 13). Ukupno, ovim smo pokusima pokazali da interakcija BT-A s opioidnim sustavom nije specifična za eksperimentalni model i vrstu boli. Osim toga, čini se da BT-A aktivira endogeni opioidni sustav samo na razini dorzalnog roga kralješnične moždine, s obzirom da naloksonazin injiciran supraspinalno (i.c.v.), u istoj dozi kao i intratekalno, nije imao učinak na djelovanje BT-A (slika 13).

Promjenu antinociceptivnog djelovanja BT-A kratkodjelujućim opioidnim antagonistom teško je povezati s poznatim mehanizmom dugotrajnog djelovanja BT-A na SNAP-25 i egzocitozu. Prema dosadašnjim saznanjima, pocijepani SNAP-25 u našem je pokusu trebao biti prisutan u SŽS-u 5 dana nakon periferne primjene toksina, odnosno prije primjene antagonista. Stoga smo provjerili je li učinak naltreksona kratkotrajan ili on traje duže i neovisno o blokadi opioidnih receptora. Za razliku od učinka 40 min prije formalinskog testa, naltrekson primijenjen 24 h prije testa nije utjecao na antinociceptivno djelovanje BT-A. Time smo pokazali da je učinak naltreksona kratkodjelujući, u skladu s njegovim farmakokinetičkim svojstvima: poluvrijeme eliminacije ( $t_{1/2}$ ) naltreksona je 4h, a njegovog glavnog aktivnog metabolita 6- $\beta$ -nalteksola 12 h nakon peroralne primjene (Meyer i sur., 1984.). Kako naltrekson ne utječe na proteolitičku aktivnost BT-A (promatranu kao clSNAP-25), interakcija je najvjerojatnije posljedica promjena na razini opioidnih receptora i/ili endogenih opioidnih peptida.

Mogućnost izravnog agonističkog djelovanja BT-A na  $\mu$ -opioidne receptore čini se nevjerojatnom, prvenstveno zbog toga što su analgetska svojstva opioidnih agonista i BT-A jako različita. Vjerojatnije objašnjenje za prethodno opisane rezultate je da BT-A tijekom boli posredno pojačava antinociceptivno djelovanje endogenog opioidnog sustava, i to kroz 1)

povećanu sintezu/oslobađanje opioidnih peptida i/ili 2) pojačanu aktivnost  $\mu$ -opioidnih receptora.

(1) Modulacija boli endogenim opioidnim peptidima kao posljedica njihove pojačane sinteze/lučenja uočena je u stanjima poput stresa (Parikh i sur., 2011.), primjene placeba (Eippert i sur., 2009.; Zubieta i sur., 2005.), infekcija (Glattard i sur., 2010.) i vježbanja (Goldfarb i Jamurtas, 1997.). Mogućnost da BT-A pojačava sintezu opioidnih peptida mogu poduprijeti studije u kojima je pokazano da intramuskularna primjena BT-A inducira sintezu mRNA enkefalina u ventralnom rogu kralješnične moždine (Humm i sur., 2000; Jung i sur., 1997.). No, Mika i sur. (2011) našli su da BT-A smanjuje ekspresiju mRNA prekursora endogenih opioidnih peptida pronociceptina, prodinorfina i proenkefalina u senzornim ganglijima (DRG), ali ne i u kralješničnoj moždini životinja s eksperimentalnom neuropatijom. Ovaj je nalaz na razini DRG-a teško povezati s trenutnim promatranjima, gdje bismo očekivali suprotno, odnosno toksinom posredovano povećanje ekspresije endogenih opioidnih peptida. Budući da je trenutno jedini poznati mehanizam djelovanja BT-A prevencija neuroegzocitoze posredovane SNARE proteinima, povećano lučenje endogenih opioida pod utjecajem BT-A moglo bi se objasniti jedino pretpostavkom da BT-A neizravno pojačava aktivaciju opioidnog sustava preko za sada nepoznatog mehanizma. Takva bi interakcija mogla uključivati nekoliko neurona i neurotransmitora, a ne može se isključiti ni sudjelovanje ne-neuronalnih stanica, poput glije (Mika i sur., 2011.; Vacca i sur., 2012.). Ako je, hipotetski, antinociceptivno djelovanje BT-A povezano s povećanim lučenjem opioidnih polipeptida, moglo bi se očekivati da su učinci BT-A i opioidnih agonista, poput morfina, slični. Međutim, njihovi su učinci međusobno jako različiti. Dok morfin smanjuje bol u objema fazama formalinskog testa (Hunskar i Hole, 1987.), BT-A djeluje samo na drugu, upalnu fazu (Cui i sur., 2004.). Također, BT-A ne povećava, a morfin povećava, normalni nocicepcijski prag podražaja (Cui i sur., 2004.; Bach-Rojecky i sur., 2005.). Ove bi razlike mogle biti posljedica selektivnosti BT-A, za razliku od morfina, za određene/ograničene podskupine neurona ili sinapsi (Matak i sur., 2014.).

(2) Druga je mogućnost da BT-A povećava ekspresiju ili funkciju  $\mu$ -opioidnih receptora. Premda trenutno za to ne postoji izravan dokaz, u prilog ovoj mogućnosti govori nalaz da BT-A antagonizira morfinom uzrokovanu toleranciju. Naime, jedan od mehanizama nastanka tolerancije je smanjenje funkcionalnih veznih mjesta na  $\mu$ -opioidnim receptorima (Vacca i sur., 2012.). Potencijalni učinak BT-A na ekspresiju receptora na membranama neurona, mogao bi biti posljedica dodatnih učinaka SNAP-25 izuzev uključenosti u egzocitozu neurotransmitora (v. Uvod, Fiziološki učinci SNAP-25).

S obzirom na navedene nalaze koji sugeriraju na posredna djelovanja periferno primijenjenog BT-A u dorzalnom rogu kralješnične moždine te, s druge strane, na kompleksnu mrežu neurotransmitora uključenih u središnju modulaciju nocicepcije, čini se malo vjerojatnim da je opioidni sustav jedini uključen u središnje antinociceptivno djelovanje BT-A.

### 5.1.2 GABA-ergički sustav

Osjetne informacije koje se prenose u dorzalni rog kralješnične moždine su pod snažnom inhibicijskom kontrolom GABA-e, koju luče lokalni interneuroni i inhibicijska silazna vlakna (Antal i sur., 1996.; Bardoni i sur., 2013.). Djelujući preko ionotropnih GABA<sub>A</sub> i metabotropnih GABA<sub>B</sub> receptora, GABA kontrolira protok osjetnih informacija regulacijom podražljivosti neurona dorzalnog roga te modulacijom lučenja neurotransmitora iz primarnih aferentnih vlakana (Bardoni i sur., 2013.; Melin i sur., 2013.).

S obzirom da smo u prethodnim pokusima pokazali uključenost spinalnog opioidnog sustava u antinociceptivno djelovanje BT-A, a da u interneuronima površinskih lamina dorzalnog roga postoji kolokalizacija enkefalina i GABA-e (Fukushima i sur., 2011.), željeli smo ispitati moguću uključenost GABA-ergičkog sustava u djelovanje BT-A. Koristeći bikukulin, antagonist GABA<sub>A</sub> receptora, pokazali smo da je antinociceptivno djelovanje BT-A ovisno i o aktivnosti GABA<sub>A</sub> receptora na spinalnoj razini. Kada je primijenjen intratekalan u niskoj dozi od 1 µg, kao i intraperitonealno u nekoliko puta višoj dozi (0.6–0.8 mg), bikukulin je poništio antinociceptivno djelovanje periferno primijenjenog BT-A na upalnu bol uzrokovanu formalinom (slika 11), što potvrđuje središnje mjesto djelovanja BT-A i interakcije s endogenim GABA-ergičkim sustavom. Slično naltreksonu, bikukulin je poništio i učinak BT-A na mehaničku hiperalgeziju i alodiniju te hladnu alodiniju u PPNI modelu (slika 12), ali i bilateralni antinociceptivni učinak BT-A u modelu karagenanom uzrokovane bilateralne boli (slika 13). U modelu bilateralne boli, također smo potvrdili da se radi o interakciji na segmentalnoj razini dorzalnog roga kralješnične moždine, s obzirom da bikukulin (1µg/10 µL) injiciran u *cisternu magnu* nije poništio obostrani učinak BT-A (slika 13).

Pretpostavljamo da je antinociceptivno djelovanje BT-A spriječeno GABA<sub>A</sub> antagonistom zbog smanjenja sinaptičke inhibicije u kralješničnoj moždini, za koju se smatra da je važan čimbenik koji doprinosi nastanku i održavanju kronične boli (Bardoni i sur., 2013). Kako zrelim GABA-ergičkim neuronima vjerojatno nedostaje SNAP-25 (Matteoli i sur., 2009.), učinak BT-A na GABA-ergičku spinalnu neurotransmisiju morao bi biti posredan. Osim toga, *in vitro* je pokazano da je SNAP-25 uključen u modulaciju GAT1 prijenosnika, čime

koordinira lučenje i ponovni povrat GABA-e (Fan i sur., 2006.). Time bi BT-A cijepanjem SNAP-25 mogao povećati GABA-ergičku neurotransmisiju. Ovaj bi učinak zbog toga bilo važno istražiti u budućim ispitivanjima.

Prema iznesenim obrazloženjima, slika antinociceptivnog djelovanja BT-A se ovim nalazima čini složenija od prvotno predložene inhibicije lučenja ekscitacijskih neurotransmitora i neuropeptida iz središnjih ogranaka primarnih aferentnih neurona te su u nju uključena barem dva spinalna inhibicijska neurotransmitorska sustava, GABA-ergički i opioidni sustav. Čini se da je cijepanje SNAP-25 u SŽS-u samo prvi korak u cjelokupnom složenom mehanizmu djelovanja BT-A, koji posredno uzrokuje aktivaciju endogenog opioidnog i GABA-ergičkog sustava.

## **5.2 Interakcija BT-A s endogenim inhibicijskim sustavima smanjuje neuronalnu aktivaciju u dorzalnog rogu**

Cilj daljnjih istraživanja u ovom radu bio je ispitati prethodno navedenu hipotezu o postojanju potencijalne neuronalne petlje, preko koje bi BT-A posredno mogao djelovati na inhibicijske sustave dorzalnog roga te koje su vrste stanica potencijalno uključene. Koristeći ekspresiju c-Fos proteina kao markera neuronalne aktivacije (Coggeshall, 2005.), pokazali smo da BT-A (5 i.j./kg i.pl.) značajno smanjuje broj c-Fos pozitivnih neurona u senzornim laminama kralješnične moždine (I–VI) kod formalinom uzrokovane boli (slike 14 i 15). Učinak BT-A na ekspresiju c-Fos proteina u kralješničnoj moždini prethodno je pokazan u formalinskom testu (Aoki, 2005.), kao i u modelu kronične upalne boli mokraćnog mjehura (Vemulakonda i sur., 2005.). U našim je pokusima učinak BT-A na nociceptivnu neuronalnu aktivaciju poništen naltreksonom (slika 14), što je u skladu s bihevioralnim učincima naltreksona na antinociceptivno djelovanje BT-A. Slično, učinak BT-A na ekspresiju c-Fos proteina bio je smanjen i bikukulinom (slika 15).

S obzirom da aktivacija glija stanica doprinosi fenomenu središnje senzitivacije i dugotrajnosti boli (v. Uvod), ispitali smo potencijalne učinke BT-A te njegove kombinacije s opioidnim antagonistom naltreksonom na ekspresiju markera astrocita (GFAP) i mikroglije (CD11b), kako bismo utvrdili jesu li u petlju uključene i glija stanice. U našim pokusima nismo uočili aktivaciju glija stanica u formalinskom testu. Prema literaturnim podacima, u formalinskom je testu glija aktivirana tek od 3. dana nakon injiciranja formalina u šapu štakora (Lin i sur., 2007.). Međutim, u različitim modelima neuropatske boli ekspresija markera aktivacije glija stanica povećana je i više od mjesec dana. U skladu s tim, i u našem



smo modelu neuropatske boli, 21. dan nakon PPNI postupka, uočili povećanu ekspresiju obje vrste glija stanica u dorzalnom rogu, ali učinci BT-A su bili različiti: značajno je smanjio ekspresiju CD11b markera, dok je povećao ekspresiju GFAP (slike 16 i 17). Ove rezultate nije moguće jednostavno objasniti, niti su oni u skladu s nalazima u miševa, gdje je BT-A smanjio aktivaciju i mikroglije i astrocita u formalinskom testu i neuropatskoj boli uzrokovanoj konstrikcijom ozljedom *n. ischiadicusa* (CCI) (Vacca i sur., 2012.; Vacca i sur., 2013.). No, čini se da je i stupanj i vrijeme aktivacije glija stanica u modelima boli različit kod različitih vrsta glodavaca. Primjerice, u miševa je već 1 h nakon injiciranja formalina u šapu povećana aktivacija i astrocita i mikroglije (Vacca i sur., 2012.). Stoga je rezultate aktivacije glije u različitim istraživanjima teško interpretirati i međusobno uspoređivati, jer se očito glija aktivira ovisno o uzroku boli, vrsti i trajanju ozljede, kao i ovisno o vrsti životinje.

Ako se C vlakna koja eksprimiraju TRPV1 receptor unište injiciranjem visoke doze kapsaicina u TG 5 dana nakon periferne primjene BT-A u područje njuške štakora (vremenski period u kojemu BT-A dolazi do SŽS-a), imunoreaktivnost cIcSNAP-25 u TNC-u izostaje (Matak i sur., 2014.). Ovaj nalaz upućuje da BT-A ostaje lokaliziran u središnjim završecima primarnih aferentnih neurona te da ne dolazi do transcitoze u području TNC-a, a čini se ni u dorzalnom rogu nakon i.pl. primjene BT-A (slika 27). U prilog ovome, kod štakora nije uočena ni kolokalizacija cIcSNAP-25 s markerom astrocita (GFAP) u TNC-u i dorzalnom rogu (Matak, 2015., Doktorski rad). Iako bi smanjenje aktivacije mikroglija stanica potencijalno moglo doprinijeti antinociceptivnom djelovanju BT-A, za sada nije poznato kojim mehanizmom te nije istraženo postoji li kolokalizacija markera mikroglije i cIcSNAP-25, koja bi ukazala na mogućnost transcitoze BT-A u mikrogliju. S obzirom da se prilikom ozljede živca iz primarnih aferentnih neurona luče ATP i kemokini (v. Uvod), koji inicijalno aktiviraju mikrogliju, BT-A bi mogao inhibirati lučenje ovih tvari i tako neizravno inhibirati aktivnost mikroglije.

Osim ekspresije CD11b, ispitali smo i moguće funkcionalne posljedice inhibicije mikroglija stanica, odnosno interferira li BT-A s lučenjem proupalnih citokina. Međutim, PCR analizom uzoraka lumbalnog L3–L5 segmenta kralješnične moždine nismo dobili rezultate koji bi bili u skladu s bihevioralnim podacima. Nije bilo značajnih razlika u ekspresiji mRNA proupalnih citokina TNF $\alpha$  i IL-1 $\beta$  između različitih skupina, ni u formalinom uzrokovanoj upalnoj boli, niti u PPNI modelu (slika 18). Dodatno, analiza ekspresije mRNA TNF $\alpha$  u kralješničnoj moždini, u različitim vremenskim točkama nakon uzrokovanja ozljede živca u PPNI modelu (slika 19), nije dala zadovoljavajuće rezultate. Nedostatak primjetnog učinka u korištenom

modelu mogao bi biti posljedica male upalne komponente u odnosu na modele konstrikcije živca (CCI) u kojima su promjene ekspresije proupalnih citokina najčešće prisutne (Uçeyler i sur., 2007.), ali i analiza cijelog lumbalnog L3–L5 segmenta umjesto ipsilateralnog dorzalnog roga, gdje očekujemo promjene. U svakom slučaju, na osnovu dobivenih proturječnih rezultata ne možemo zaključiti koliku zadaću glija stanice imaju u ukupnom antinociceptivnom djelovanju BT-A, no čini se da nisu uključene u potencijalno djelovanje BT-A na opioidni sustav.

Temeljem svega navedenog, ostaje neodgovoreno pitanje kako su spinalni opioidni i GABA-ergički sustav stimulirani lijekom koji blokira lučenje neurotransmitora. Analizom ekspresije mRNA  $\mu$ -opioidnih receptora u lumbalnom L3–L5 dijelu kralješnične moždine te proteinske ekspresije Leu/Met-enkefalina u dorzalnom rogu nismo uočili značajne promjene nakon i.pl. primjene BT-A (slike 20, 21 i 22). Ove su dvije mete odabrane za analizu temeljem rezultata učinaka naloksonazina (selektivnog  $\mu$ -opioidnog antagonista) na antinociceptivno djelovanje BT-A u bihevioralnim testovima nocicepcije. Iako je afinitet  $\mu$ -opioidnih receptora najveći za endorfine, istraživanja su pokazala da se ne oni luče na spinalnoj razini (Marvizón i sur., 2009.). Zbog toga smo pretpostavili da bi BT-A mogao pojačati lučenje enkefalina. Smatramo da je izostanak značajnih učinaka na spomenute mete posljedica nedostataka naših metoda analize. Kako je prethodno spomenuto kod analize citokina, to je korištenje cijelog L3–L5 segmenta kralješnične moždine u qRT-PCR analizi  $\mu$ -opioidnih receptora, umjesto ipsilateralnog dorzalnog roga, te korištenje imunohistokemije koja vjerojatno nije dovoljno selektivna metoda za analizu ekspresije Leu/Met-enkefalina. U cilju rasvjetljavanja učinka BT-A na endogeni opioidni sustav, bilo bi važno ispraviti ove nedostatke, ali u analizu uključiti i druge endogene opioidne peptide. Rezultati ovih pokusa mogli bi usmjeriti klinička ispitivanja, jer bi kombiniranje BT-A s opioidnim analgeticima moglo biti korisna terapijska strategija kojom bi se potencijalno mogle smanjiti doze i nuspojave opioidnih agonista.

### **5.3 Mjesto središnjeg antinociceptivnog djelovanja BT-A: segmentalni učinak na spinalnoj razini**

Dugo se vremena smatralo da aksonalni transport BT-A ne postoji zbog dominantnih lokalnih, perifernih učinaka u kolinergičkim sinapsama nakon periferne primjene toksina. No, brojne prekliničke nalaze o udaljenim učincima BT-A u različitim eksperimentalnim modelima boli (v. Uvod) bilo je teško objasniti uvriježenom hipotezom o inhibiciji lučenja neurotransmitora isključivo na perifernim završecima osjetnih neurona (Aoki, 2005.; Aoki i

Francis, 2011.). Otkrića koja su slijedila bihevioralne rezultate poput: a. enzimске aktivnosti BT-A (cSNAP-25) u senzornim područjima SŽS-a nakon periferne primjene (Matak i sur., 2011., 2012.); b. odgode pojave cSNAP-25 imunoreaktivnosti, koja je u vremenskom skladu s početkom antinociceptivnog djelovanja BT-A; c. izostanka imunoreaktivnosti cSNAP-25 (Matak i sur., 2011.) i antinociceptivnog djelovanja (Bach-Rojecky i Lacković, 2009.; Matak i sur., 2011.; Filipović i sur., 2012.) periferno primijenjenog BT-A ukoliko se transport kroz aksone prethodno blokira ireverzibilnom depolimerizacijom tubulina primjenom kolhicina, snažni su dokazi da je antinociceptivno djelovanje BT-A središnjeg porijekla. Međutim, nije poznato na kojoj bi razini SŽS-a BT-A mogao djelovati. Brži (već nakon 24 h) antinociceptivni učinak i u nižoj dozi (1 i.j./kg) nakon intratekalne primjene, u odnosu na perifernu primjenu (Bach-Rojecky i Lacković, 2009.), ukazuje da bi dorzalni rog kralješnične moždine mogao biti primarno mjesto njegovog antinociceptivnog djelovanja. Kako bismo ispitali i ostala moguća mjesta djelovanja BT-A u SŽS-u, istraživali smo učinke supraspinalne primjene BT-A u moždane komore (i.c.v.) ili u *cisternu magnu* (i.c.) u nekoliko različitih modela boli te ih usporedili s istom dozom BT-A primijenjenom intratekalno. Pritom smo koristili eksperimentalne modele boli koji do sada nisu istraženi, a koji su potencijalno klinički važni zbog trenutnog nedostatka učinkovitog i sigurnog liječenja. Osim toga, analizirali smo imunoreaktivnost cSNAP-25 kao markera prisutnosti aktivnog BT-A u prerezima moždanog tkiva nakon njegove i.c.v. ili i.c. primjene, kako bismo utvrdili distribuciju BT-A u regijama mozga.

### **5.3.1 BT-A smanjuje visceralnu bol različitog uzroka nakon spinalne primjene**

Za razliku od različitih vrsta somatske boli, pretklinička istraživanja antinociceptivnog djelovanja BT-A na eksperimentalnim modelima visceralne boli, odnosno boli porijeklom iz unutarnjih organa, ograničena su samo na istraživanje lokalne primjene BT-A na spontano bolno ponašanje u dva modela, cistitisa i prostatitisa (Chuang i sur., 2004., 2008., 2009.). Međutim, visceralna je bol, za razliku od somatske, slabo lokalizirana (zbog manje gustoće nociceptora); tipično se širi u somatske strukture, npr. mišić ili kožu (zbog viscerosomatske konvergencije u dorzalnom rogu kralješnične moždine; v. Uvod), pri čemu može nastati i prenesena hiperalgezija; ima jaču emocionalnu i autonomnu komponentu (zbog autonomne inervacije unutarnjih organa) te nepouzdanu povezanost između intenziteta boli i patološkog uzroka boli (Ness, 1999.; Sanoja i sur., 2010.). Iako se akutni oblici visceralne boli uspješno liječe postojećim analgeticima i adjuvansima, kronični su oblici većinom refraktorni na

postojeće terapijske opcije, varijabilna im je učinkovitost, kratko djeluju, a dugotrajnom primjenom raste rizik nastanka nuspojava (Davis i sur., 2012.).

Koristeći eksperimentalne modele peritonitisa i kolitisa, po prvi puta smo ispitali učinke BT-A na visceralnu hiperosjetljivost i to nakon njegove periferne primjene na mjesto izazivanja boli (i.p. u modelu peritonitisa; i.col. u modelu kolitisa) i nakon središnje primjene (i.t. i i.c. u oba modela). Odabrani se modeli međusobno razlikuju:

1. Kapsaicinom uzrokovana bol kolona predstavlja visceralnu bol, povezanu s aktivacijom samo visceralnih nociceptora (Sanoja i sur., 2010.), dok se zbog moguće senzitivizacije somatskih peritonealnih receptora octenom kiselinom model peritonitisa smatra modelom miješane somatsko-visceralne boli (Ness, 1999.);
2. Uz *n. splanchnicus* i *n. pelvicus*, viscero-motorni odgovor na primjenu i.p. octene kiseline dodatno uključuje i *n. vagus* (De Groat, 1986.; Sengupta, 2009.), zbog čega smo pretpostavili da bi u ovom modelu BT-A nakon i.c. primjene mogao doći do jezgara vagusa i tu djelovati na bol uzrokovanu octenom kiselinom;
3. U modelu kolitisa razvija se prenesena hiperalgezija, karakteristična za visceralnu bol, zbog konvergencije somatskih uzlaznih vlakana na viscerosceptivne spinalne neurone (Cervero, 2000.; Traub, 2003.). Ovaj fenomen posljedica je pojačane transmisije bolne informacije isključivo na razini dorzalnog roga. U modelu peritonitisa, prenesena hiperalgezija nije opisana (Koster i sur, 1959.).
4. Za razliku od somatskih, visceralni primarni aferentni neuroni ulaze višestruko u spinalne segmente ispod i iznad segmenta ulaza u kralješničnu moždinu. Također stvaraju sinapse i s ipsilateralnim i kontralateralnim neuronima površinskih i dubokih senzornih lamina (Sugiura i Tonosaki, 1995.). Sve to uzrokuje opsežnu i difuznu aktivaciju SŽS-a, čime se onemogućuje preciznost u lokalizaciji somatskog podražaja. Stoga smo učinak intratekalnog BT-A na stupanj neuronalne aktivacije ispitali u modelu kolitisa, u kojem je bol uzrokovana samo u kolonu te smo smatrali da će eventualne promjene u aktivaciji neuronalnih stanica biti vidljivije.

BT-A, primijenjen intratekalno, u dozi od 2 i.j./kg značajno je smanjio broj abdominalnih grčeva u oba modela (slika 23 i 24), kao i prenesenu hiperalgeziju uzrokovanu i.col. primjenom kapsaicina (slika 24). U modelu kolitisa, BT-A je smanjio i ekspresiju c-Fos proteina u dorzalnom rogu sakralnog S2/S3 segmenta kralješnične moždine u odnosu na životinje koje nisu tretirane BT-A (slika 25). Ovi se rezultati slažu s rezultatima Coelho i sur. (2014) koji su nedavno pokazali da BT-A, primijenjen intratekalno smanjuje prenesenu hiperalgeziju u modelu ciklofosfamidom uzrokovanog cistitisa. Učinak intratekalnog BT-A

na hiperalgeziju prenesenu na somatske strukture posebno je važan nalaz, s obzirom da se radi o fenomenu koji je posredovan procesima središnje senzitivacije, slično mehanizmima središnje senzitivacije kod somatske boli (Gebhart i Bielefeldt, 2008.), a isključivo se odvija u dorzalnog rogu kralješnične moždine radi konvergencije somatskih i viscerosceptivnih neurona (Cervero, 2000.; Traub 2003.). No osim toga, pretkliničkim (Sanoja i sur., 2010.) i kliničkim istraživanjima (Wilder-Smith i Robert-Yap, 2007.; Brock i sur., 2010., Wilder-Smith i sur., 2014.) pokazano je da nastanku visceralne hiperalgezije doprinosi i facilitacijski utjecaj silaznih modulacijskih putova iz RVM. S obzirom na navedene mehanizme nastanka, i.t. primijenjen BT-A mogao bi inhibirati lučenje ekscitacijskih neurotransmitora iz središnjih završetaka primarnih aferentnih vlakana, ali i lučenje neurotransmitora iz silaznih vlakana koji su odgovorni za facilitaciju prijenosa bolnog podražaja i nastanak somatske i visceralne hiperalgezije (Sanoja i sur., 2010.).

Iako je bolni odgovor na i.p. primjenu octene kiseline djelomično posredovan *n. vagusom* (Sengupta, 2009.), BT-A primijenjen u istoj dozi i volumenu u *cisternu magnu* nije djelovao (slika 23), što upućuje na segmentalni učinak BT-A na spinalnoj razini.

U modelu eksperimentalnog peritonitisa, intraperitonealna primjena BT-A (15 i.j./kg) uzrokovala je značajnu slabost abdominalnih mišića, zbog čega su abdominalne kontrakcije uzrokovane i.p. primjenom octene kiseline izostale te je time procjena nocicepcije bila nepouzdana. Iako znakove paralize nismo uočili nakon lokalne primjene BT-A (10 i.j./kg) u lumen kolona u modelu kolitisa, antinociceptivni učinak je također izostao. Razlozi bi mogli biti u mogućem kratkom zadržavanju BT-A u kolonu, nedovoljnoj apsorpciji BT-A iz kolona ili nemogućnosti BT-A da uđe u živčane završetke u lumenu kolona. Treća se opcija čini najvjerojatnijom, s obzirom da je pokazano da nakon instilacije BT-A u lumen mokraćnog mjehura u zamorčića, BT-A ne ulazi u živčane završetke (Coelho i sur., 2012.), ali injiciran u mišićje mokraćnog mjehura smanjuje bol kod cistitisa (Cayan i sur., 2003.).

### **5.3.2 BT-A smanjuje bilateralnu bol uzrokovanu unilateralom ozljedom**

Bilateralna bol nakon unilateralne ozljede (engl. *mirror pain* ili *mirror-image pain*) specifičan je fenomen nedovoljno jasnog mehanizma nastanka. Učestalost ovog poremećaja kod ljudi nikad nije istražena, no u opisani su slučajevi bilateralne boli ili promijenjene senzorne percepcije kod kroničnih bolnih stanja, poput kompleksnog regionalnog bolnog sindroma, sindroma karpalnog tunela ili boli nakon torakotomije, te nakon ozljede perifernih živaca (Konopka i sur., 2012.). S druge strane, u eksperimentalnim uvjetima kod

laboratorijskih životinja bilateralna se bol može izazvati različitim vrstama (upalnim i neuropatskim) unilateralnih ozljeda kože, mišića, zglobova i perifernih živaca. Eksperimentalni dokazi sugeriraju da mehanizmi kontralateralnog širenja boli uključuju još nedovoljno poznate spinalne neuralne putove (Koltzenburg i sur., 1999.; Shenker i sur., 2003.; Jancalek i sur., 2011.), uz facilitaciju supraspinalnih silaznih putova (Tillu i sur., 2008.; Radhakrishnan i Sluka, 2009.).

Antinociceptivni učinak BT-A prethodno je istražen u nekoliko takvih modela, poput ne-upalne mišićne boli uzrokovane dvostrukim i.m. injiciranjem fiziološke otopine pH 4,0 (Bach-Rojecky i Lacković, 2009.), trigeminalne neuropatije uzrokovane podvezivanjem infraorbitalnog živca (Filipović i sur., 2012.) i upalne boli uzrokovane injiciranjem CFA u temporomandibularni zglob (Lacković i sur., 2016.). U svim je modelima BT-A nakon periferne unilateralne primjene smanjio bolnu preosjetljivost na obje strane. Bilateralno djelovanje BT-A je pokazano i u eksperimentalnim modelima polineuropatije uzrokovane paklitakselom (Favre-Guilmard i sur., 2009.) i streptozotocinom (Bach-Rojecky i sur., 2010.). Učinak periferno primijenjenog BT-A na udaljenim mjestima, kao što je djelovanje na strani suprotnoj od mjesta ozljede jedan je od glavnih bihevioralnih nalaza koji je sugerirao središnje mjesto antinociceptivnog djelovanja.

U ovom je doktorskom radu, u do sada neistraženom modelu kronične bilateralne boli koja nastaje 2 tjedna nakon i.m. injiciranja  $\lambda$ -karagenana, BT-A smanjio bolnu preosjetljivost 5 dana nakon unilateralne i.pl. primjene (5 i.j/kg) i 1 dan nakon i.t. primjene (1 i.j.), što je u skladu s prethodnim istraživanjima (Bach-Rojecky i Lacković, 2009.; Bach-Rojecky i sur., 2010.). Imunohistokemijskom analizom pocijepanog SNAP-25 proteina u dorzalnom rogu kralješnične moždine pokazali smo samo ipsilateralnu proteolitičku aktivnost BT-A, dok u kontralateralnom dorzalnom rogu nismo pronašli na cSNAP-25 pozitivna vlakna (slika 28), što sugerira da BT-A ostaje na ipsilateralnoj strani dorzalnog roga te da je kontralateralni antinociceptivni učinak vjerojatno posljedica posrednih, još uvijek nepoznatih promjena.

Za razliku od npr. prenesene boli iz visceralnih organa na pripadajući dermatom, anatomska pozadina prijenosa boli s jedne strane specifično na homologno mjesto na kontralateralnoj strani, nije jasna. Prema nekoliko preglednih članaka o eksperimentalnoj bilateralnoj boli uzrokovanoj unilateralnom ozljedom živca (Koltzenburg i sur., 1999.) ili unilateralnom upalom (Shenker i sur., 2003.), pretpostavlja se da u tom prijenosu najvjerojatnije sudjeluju komisuralni interneuroni, koji stvaraju sinapse između dvije strane kralješnične moždine (Koltzenburg i sur., 1999.; Jancalek, 2011.). Uz spinalne mehanizme središnje senzitivacije (Skyba i sur., 2002., 2005.), pokazano je da nastanku, kontralateralnom širenju i kroničnosti

sekundarne mišićne hiperalgezije nakon dvostrukog i.m. injiciranja kisele fiziološke otopine doprinosi i jačanje facilitirajućih silaznih putova iz RVM (Ren i Dubner, 1996.; Tillu i sur., 2008.; Radhakrishnan i Sluka, 2009.; Da Silva i sur., 2010.). Sličnim se mehanizmima smatra da nastaje bilateralna bol uzrokovana i.m. karagenanom, s obzirom da se upalna reakcija (miozitis) javlja samo na ipsilateralnoj strani (Radhakrishnan i sur., 2003.), odnosno ne postoji oštećenje u kontralateralnom mišiću, koje bi teorijski moglo uzrokovati kontralateralnu bol. Osim toga, transkutana električna stimulacija živaca (engl. *transcutaneous electrical nerve stimulation*, TENS), čiji je učinak u najvećoj mjeri posredovan modulacijom transmisije u RVM (Kalra i sur., 2001; DeSantana i sur. 2009.), smanjuje bilateralnu bol uzrokovanu karagenanom neovisno o strani primjene (Ainsworth i sur., 2006.). Izostanak antinociceptivnog učinka BT-A primijenjenog u *cisternu magnu* stoga bi mogao sugerirati da antinociceptivni učinak BT-A uključuje samo segmentalne spinalne putove uključene u prijenos boli na kontralateralnu stranu.

BT-A primijenjen kontralateralno strani uzrokovanja boli također nije bio učinkovit u smanjenju bolne preosjetljivosti ni na jednoj strani (slika 13). Ovaj je nalaz drugačiji od nalaza u modelu i.m. injiciranja kisele fiziološke otopine, gdje je BT-A primijenjen kontralateralno i.pl. smanjio mehaničku hiperalgezu, ali samo na strani primjene (Bach-Rojecky i Lacković, 2009.). Ovi bi se proturječni nalazi mogli objasniti razlikama između korištenih modela. Prvo, protokoli uzrokovanja boli i vremensko razdoblje u kojem nastaje kontralateralna bol međusobno se razlikuju, pri čemu se u modelu dvostrukog injiciranja kisele fiziološke otopine bilateralna bol razvija 24 h nakon i.m. primjene druge injekcije fiziološke otopine pH 4,0, dok se u karagenanskom modelu bilateralna bol razvija tek 14 dana nakon jednokratne primjene karagenana (Sluka i sur., 2001.; Radhakrishnan i sur., 2003.). Drugo, za razliku od kisele fiziološke otopine, koja bilateralnu bol uzrokuje bez oštećenja perifernog tkiva (Sluka i sur., 2001.),  $\lambda$ -karagenan uzrokuje akutnu upalnu reakciju mišića, koja napreduje u kroničnu upalnu reakciju u vremenskom razdoblju koje odgovara nastanku kontralateralne hiperalgezije (Radhakrishnan i sur., 2003.). Osim toga, nalazi iz područja trigeminalne inervacije su opet drugačiji, budući da BT-A neovisno o strani primjene smanjuje bilateralnu bolnu preosjetljivost uzrokovanu infraorbitalnim podvezivanjem okcipitalnog živca ili primjenom CFA u temporomandibularni zglob (Filipović i sur., 2012.; Lacković i sur., 2016.). Svim spomenutim modelima bilateralne boli zajedničko je da BT-A smanjuje bilateralnu bol ako se primijeni na strani ozljede. Međutim, postoje značajne razlike u djelovanju BT-A ako se primijeni na stranu suprotno od ozljede. Za sada nema

jednoznačnog zaključka već možemo samo pretpostavljati da su za takve diskrepantne rezultate mogući razlozi način uzrokovanja boli, vrsta ozljede i područje inervacije.

Kako bismo dodatno potvrdili nalaze bihevioralnih opažanja iz modela visceralne i bilateralne boli i potvrdili hipotezu o mogućem segmentalnom djelovanju BT-A na spinalnoj razini, istražili smo imunohistokemijski lokalizaciju c1SNAP-25 proteina nakon supraspinalne primjene BT-A. Imunoreaktivnost c1SNAP-25 nakon i.c. i i.c.v. primjene BT-A ranije nije ispitana. Time smo prvi pokazali da BT-A primijenjen izravno u moždane komore cijepa SNAP-25 u određenim regijama mozga uključenim u nocicepciju, poput talamusa, hipokampusa, PAG-a i LC-a (slika 29). Nakon primjene u *cisternu magnu* c1SNAP-25 imunoreaktivnost najvećim je dijelom prisutna u produženoj moždini, uz pojedinačna imunoreaktivna vlakna u LC-u (slika 30), dok u udaljenijim regijama mozga nije uočena. Prisutnost pocijepanog SNAP-25 u TNC-u nakon i.c. primjene objašnjava antinociceptivno djelovanje BT-A u orofacijalnom formalinskom testu.

Ovi nalazi sugeriraju da BT-A nakon i.c. i i.c.v. primjene putuje do dubokih supraspinalnih nocicepcijskih regija, no ne djeluje na bol, i time potvrđuju tvrdnje o segmentalnom antinociceptivnom djelovanju.



## **6 ZAKLJUČCI**

U ovom doktorskom radu:

1. Prvi puta je pokazano da središnje antinociceptivno djelovanje BT-A konzistentno u patofiziološki različitim modelima boli (upalnoj, neuropatskoj i bilateralnoj mišićnoj) uključuje interakciju s endogenim opioidnim i GABA-ergičkim sustavom na spinalnoj razini, što bi moglo biti razlogom smanjenja patološke bolne preosjetljivosti. Temeljem dosadašnjeg znanja, BT-A istražene inhibicijske neurotransmitske sustave aktivira neizravno i za sada još nepoznatim mehanizmom, s obzirom da korištenim metodama analize tkiva nismo uspjeli detektirati promjene u ekspresiji  $\mu$ -opioidnih receptora i Leu/Met-enkefalina u dorzalnog rogu. Rezultati ukazuju da aktivacija opioidnog i GABA-ergičkog sustava posredovana botulinum toksinom A smanjuje aktivaciju neurona (c-Fos ekspresija) dorzalnog roga.
2. Ispitano je antinociceptivno djelovanje BT-A u neistraženim modelima visceralne i bilateralne boli, što bi moglo doprinijeti kliničkoj primjeni BT-A. Potvrđen je bilateralni antinociceptivni učinak unilateralno primijenjenog BT-A, što ga čini jedinim poznatim lijekom s takvim svojstvom te bi se potencijalna korist mogla ispitati u slučajevima bilateralne boli, pa čak i fantomske boli, u ljudi. Osim toga, povoljno djelovanje na visceralnu spontanu i prenesenu bol nakon intratekalne primjene moglo bi biti korisno u liječenju kronične visceralne boli, refraktorne na primjenu konvencionalnih analgetika.
3. BT-A primijenjen supraspinalno u *cisternu magnu* nije smanjio visceralnu i bilateralnu bol, niti upalnu bol uzrokovanu formalinom nakon primjene u *cisternu magnu* ili moždane komore. Istraživanjem prisutnosti enzimske aktivnosti BT-A u mozgu i produženoj moždini nakon i.c. i i.c.v. primjene prvi smo put otkrili da BT-A putuje do dubokih supraspinalnih regija uključenih u nocicepciju, no ne djeluje na bol. Zajedno s prethodnim nalazima time možemo zaključiti da je po prvi puta otkriveno se središnji učinak BT-A odvija na segmentalnoj razini (spinalnoj u našim pokusima).

## **7 LITERATURA**

- Ablin JN, Buskila D (2013) Fibromyalgia syndrome: novel therapeutic targets. *Maturitas* **75**: 335–340
- Ainsworth L, Budelier K, Clinesmith M, Fiedler A, Landstrom R, Leeper BJ, Moeller L, Mutch S, O'Dell K, Ross J, Radhakrishnan R, Sluka KA (2006) Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) reduces chronic hyperalgesia induced by muscle inflammation. *Pain* **120**(1–2): 182–187
- Alba-Delgado C, El Khoueiry C, Peirs C, Dallel R, Artola A, Antri M (2015) Subpopulations of PKC $\gamma$  interneurons within the medullary dorsal horn revealed by electrophysiologic and morphologic approach. *Pain* **156**(9): 1714-1728
- Allergan<sup>®</sup> (revidirano u siječnju 2016.) Full BOTOX<sup>®</sup> Product Information Including Boxed Warning. [Internet] Raspoloživo na: [http://www.allergan.com/assets/pdf/botox\\_pi.pdf](http://www.allergan.com/assets/pdf/botox_pi.pdf)  
Pristupljeno: 08.02.2017.
- Anand P, Bley K (2011) Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch. *Br J Anaesth* **107**(4): 490–502
- Antal M, Petkó M, Polgár E, Heizmann CW, Storm-Mathisen J (1996) Direct evidence of an extensive GABAergic innervation of the spinal dorsal horn by fibres descending from the rostral ventromedial medulla. *Neuroscience* **3**(2): 509–518
- Antonucci F, Rossi C, Gianfranceschi L, Rossetto O, Caleo M (2008) Long-distance retrograde effects of botulinum neurotoxin A. *J Neurosci* **28**(14): 3689-3696
- Aoki KR (2005) Review of a proposed mechanism for the antinociceptive action of botulinum toxin type A. *Neurotoxicology* **26**(5): 785-793
- Aoki KR, Francis J (2011) Updates on the antinociceptive mechanism hypothesis of botulinum toxin A. *Parkinsonism Relat Disord* **17**(1): S28-33
- Apostolidis A, Popat R, Yiangou Y, Cockayne D, Ford AP, Davis JB, Dasgupta P, Fowler CJ, Anand P (2005) Decreased sensory receptors P2X3 and TRPV1 in suburothelial nerve fibers following intradetrusor injections of botulinum toxin for human detrusor overactivity. *J Urol* **174**(3): 977-982
- Arendt-Nielsen L, Nie H, Laursen MB, Laursen BS, Madeleine P, Simonsen OH, Graven-Nielsen T (2010) Sensitization in patients with painful knee osteoarthritis. *Pain* **149**(3): 573-581
- Arezzo JC, Schaumburg HH, Spencer PS (1982) Structure and function of the somatosensory system: a neurotoxicological perspective *Environ Health Perspect* **44**: 23–30

- Argoff CE (2002) A focused review on the use of botulinum toxins for neuropathic pain. *Clin J Pain* **18(6 Suppl)**: S177-181
- Arnon SS, Schechter R, Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Fine AD, Hauer J, Layton M, Lillibridge S, Osterholm MT, O'Toole T, Parker G, Perl TM, Russell PK, Swerdlow DL, Tonat K; Working Group on Civilian Biodefense (2001) Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA* **285(8)**: 1059-1070
- Auguet M, Favre-Guilmond C, Chabrier PE (2008) Analgesic effects of botulinum toxin A in an inflammatory pain model in rats: comparison of Dysport and Botox; synergistic interaction with morphine. *Abstract. Toxicon* **51**, 1e54
- Bach-Rojecky L, Lacković Z (2005) Antinociceptive effect of botulinum toxin type A in rat model of carrageenan and capsaicin induced pain. *Croat Med J* **46(2)**: 201-208
- Bach-Rojecky L, Relja M, Lacković Z (2005) Botulinum toxin type A in experimental neuropathic pain. *J Neural Transm (Vienna)* **112(2)**: 215-219
- Bach-Rojecky L, Dominis M, Lacković Z (2008) Lack of antiinflammatory effect of botulinum toxin type A in experimental models of inflammation. *Fundam Clin Pharmacol* **22(5)**: 503-509
- Bach-Rojecky L, Lacković Z (2009) Central origin of the antinociceptive action of botulinum toxin type A. *Pharmacol Biochem Behav* **94(2)**: 234-238
- Bach-Rojecky L, Salković-Petrisić M, Lacković Z (2010) Botulinum toxin type A reduces pain supersensitivity in experimental diabetic neuropathy: bilateral effect after unilateral injection. *Eur J Pharmacol* **633(1-3)**: 10-14
- Barash JR, Arnon SS (2014) A novel strain of Clostridium botulinum that produces type B and type H botulinum toxins. *J Infect Dis* **209(2)**: 183-191
- Bardoni R, Takatawa T, Tong CK, Choudhury P, Scherre G, MacDermott AB (2013) Pre- and postsynaptic inhibitory control in the spinal cord dorsal horn. *Ann NY Acad Sci* **1279**: 90-96
- Besson JM (1999) The neurobiology of pain. *Lancet* **353(9164)**: 1610-1615
- Black JD, Dolly JO (1986) Interaction of 125I-labeled botulinum neurotoxins with nerve terminals. I. Ultrastructural autoradiographic localization and quantitation of distinct membrane acceptors for types A and B on motor nerves. *J Cell Biol* **103(2)**: 521-534
- Blasi J, Chapman ER, Link E, Binz T, Yamasaki S, De Camilli P, Südhof TC, Niemann H, Jahn R (1993) Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature* **365(6442)**: 160-163

- Blersch W, Schulte-Mattler WJ, Przywara S, May A, Bigalke H, Wohlfarth K (2002) Botulinum toxin A and the cutaneous nociception in humans: a prospective, double-blind, placebo-controlled, randomized study. *J Neurol Sci* **205(1)**: 59-63
- Blumberg H, Jänig W (1984) Discharge pattern of afferent fibers from a neuroma. *Pain* **20(4)**: 335-353
- Bomba-Warczak E, Vevea JD, Brittain JM, Figueroa-Bernier A, Tepp WH, Johnson EA, Yeh FL, Chapman ER (2016) Interneuronal Transfer and Distal Action of Tetanus Toxin and Botulinum Neurotoxins A and D in Central Neurons. *Cell Rep* **16(7)**: 1974-1987
- Brock C, Andresen T, Frøkjær JB, Gale J, Olesen AE, Arendt-Nielsen L, Drewes AM (2010) Central pain mechanisms following combined acid and capsaicin perfusion of the human oesophagus. *Eur J Pain* **14(3)**: 273-281
- Burstein R, Zhang X, Levy D, Aoki KR, Brin MF (2014) Selective inhibition of meningeal nociceptors by botulinum neurotoxin type A: therapeutic implications for migraine and other pains. *Cephalalgia* **34(11)**: 853-869
- Bushnell MC (1995) Thalamic processing of sensory-discriminative and affective-motivational dimensions of pain. U: Besson JM, Guilbaud G, Ollat H (Ur.) Forebrain Areas Involved in Pain Processing, John Libbey Eurotext, Pariz; 63-78.
- Carlton SM (2001) Peripheral excitatory amino acids. *Curr Opin Pharmacol* **1(1)**: 52-56
- Carmichael NM, Dostrovsky JO, Charlton MP (2010) Peptide-mediated transdermal delivery of botulinum neurotoxin type A reduces neurogenic inflammation in the skin. *Pain* **149(2)**: 316-324
- Cayan S, Coşkun B, Bozlu M, Acar D, Akbay E, Ulusoy E (2003) Botulinum toxin type A may improve bladder function in a rat chemical cystitis model. *Urol Res* **30(6)**: 399-404
- Cervero F (2000) Visceral pain-central sensitisation. *Gut* **47(Suppl 4)**: iv56-iv57
- Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* **53(1)**:55-63
- Cheng J, Liu W, Duffney LJ, Yan Z (2013) SNARE proteins are essential in the potentiation of NMDA receptors by group II metabotropic glutamate receptors. *J Physiol* **591(16)**: 3935-3947
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162(1)**: 156-159

- Chuang YC, Yoshimura N, Huang CC, Chiang PH, Chancellor MB (2004) Intravesical botulinum toxin a administration produces analgesia against acetic acid induced bladder pain responses in rats. *J Urol* **172(4 Pt 1)**: 1529-1532
- Chuang YC, Yoshimura N, Huang CC, Wu M, Chiang PH, Chancellor MB (2008) Intraprostatic botulinum toxin a injection inhibits cyclooxygenase-2 expression and suppresses prostatic pain on capsaicin induced prostatitis model in rat. *J Urol* **180(2)**: 742-748
- Chuang YC, Yoshimura N, Huang CC, Wu M, Chiang PH, Chancellor MB (2009) Intravesical botulinum toxin A administration inhibits COX-2 and EP4 expression and suppresses bladder hyperactivity in cyclophosphamide-induced cystitis in rats. *Eur Urol* **56(1)**: 159-166
- Clark AK, Malcangio M (2014) Fractalkine/CX3CR1 signaling during neuropathic pain. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **8**: 121
- Coelho A, Cruz F, Cruz CD, Avelino A (2012) Spread of onabotulinumtoxinA after bladder injection. Experimental study using the distribution of cleaved SNAP-25 as the marker of the toxin action. *Eur Urol* **61(6)**: 1178-1184
- Coelho A, Oliveira R, Rossetto O, Cruz CD, Cruz F, Avelino A (2014) Intrathecal administration of botulinum toxin type A improves urinary bladder function and reduces pain in rats with cystitis. *Eur J Pain* **18(10)**: 1480-1489
- Coggeshall RE (2005) Fos, nociception and the dorsal horn. *Prog Neurobiol* **77(5)**: 299-352
- Condliffe SB, Corradini I, Pozzi D, Verderio C, Matteoli M (2010) Endogenous SNAP-25 regulates native voltage-gated calcium channels in glutamatergic neurons. *J Biol Chem* **285(32)**: 24968-24976
- Correa JD, Paiva-Lima P, Rezende RM, Dos Reis WG, Ferreira-Alves DL, Bakhle YS, Francischi JN (2010) Peripheral mu-, kappa- and delta-opioid receptors mediate the hypoalgesic effect of celecoxib in a rat model of thermal hyperalgesia. *Life Sci* **86(25-26)**: 951-956
- Cui M, Khanijou S, Rubino J, Aoki KR (2004) Subcutaneous administration of botulinum toxin A reduces formalin-induced pain. *Pain* **107(1-2)**: 125-133
- Da Silva LF, Desantana JM, Sluka KA (2010) Activation of NMDA receptors in the brainstem, rostral ventromedial medulla, and nucleus reticularis gigantocellularis mediates mechanical hyperalgesia produced by repeated intramuscular injections of acidic saline in rats. *J Pain* **11(4)**: 378-387

- da Silva LB, Karshenas A, Bach FW, Rasmussen S, Arendt-Nielsen L, Gazerani P (2014) Blockade of glutamate release by botulinum neurotoxin type A in humans: a dermal microdialysis study. *Pain Res Manag* **19(3)**: 126-132
- da Silva LB, Poulsen JN, Arendt-Nielsen L, Gazerani P (2015) Botulinum neurotoxin type A modulates vesicular release of glutamate from satellite glial cells. *J Cell Mol Med* **19(8)**: 1900-1909
- Davis MP (2012) Drug Management of Visceral Pain: Concepts from Basic Research. *Pain Res Treat* **2012**: 265605
- de Freitas RL, Kübler JM, Elias-Filho DH, Coimbra NC (2012) Antinociception induced by acute oral administration of sweet substance in young and adult rodents: the role of endogenous opioid peptides chemical mediators and  $\mu(1)$ -opioid receptors. *Pharmacol Biochem Behav* **101(2)**: 265-270
- De Groat WC (1986) Spinal cord projections and neuropeptides in visceral afferent neurons. *Prog Brain Res* **67**: 165-187
- DeSantana JM, Da Silva LF, De Resende MA, Sluka KA (2009) Transcutaneous electrical nerve stimulation at both high and low frequencies activates ventrolateral periaqueductal grey to decrease mechanical hyperalgesia in arthritic rats. *Neuroscience* **163(4)**: 1233-1241
- D'Mello R, Dickenson AH (2008) Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth* **101(1)**: 8-16
- Dodick DW, Turkel CC, DeGryse RE, Aurora SK, Silberstein SD, Lipton RB, Diener HC, Brin MF; PREEMPT Chronic Migraine Study Group (2010) OnabotulinumtoxinA for treatment of chronic migraine: pooled results from the double-blind, randomized, placebo-controlled phases of the PREEMPT clinical program. *Headache* **50(6)**: 921-936
- Dolly JO, Wang J, Zurawski TH, Meng J (2011) Novel therapeutics based on recombinant botulinum neurotoxins to normalize the release of transmitters and pain mediators. *FEBS J* **278(23)**: 4454-4466
- Dressler D (2013) Botulinum toxin therapy: its use for neurological disorders of the autonomic nervous system. *J Neurol* **260(3)**: 701-713
- Dubner R, Ruda MA (1992) Activity-dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation. *Trends Neurosci* **15**: 96-103



- Durham PL, Cady R, Cady R (2004) Regulation of calcitonin gene-related peptide secretion from trigeminal nerve cells by botulinum toxin type A: implications for migraine therapy. *Headache* **44(1)**: 35-42
- Dworkin RH, O'Connor AB, Audette J, i sur. (2010) Recommendations for the Pharmacological Management of Neuropathic Pain: An Overview and Literature Update. *Mayo Clinic Proceedings*. **85(3 Suppl)**: S3-S14
- Eippert F, Bingel U, Schoell ED, Yacubian J, Klinger R, Lorenz J, Büchel C (2009) Activation of the opioidergic descending pain control system underlies placebo analgesia. *Neuron* **63(4)**: 533-543
- Fan FJ, Bao L, Pei G (2006) SNAP-25/syntaxin 1A complex functionally modulates neurotransmitter gamma-aminobutyric acid reuptake. *J Biol Chem* **281(38)**: 28174-28184
- Favre-Guilhard C, Auguet M, Chabrier PE (2009) Different antinociceptive effects of botulinum toxin type A in inflammatory and peripheral polyneuropathic rat models. *Eur J Pharmacol* **617(1-3)**: 48-53
- Fields H (2004) State-dependent opioid control of pain. *Nat Rev Neurosci* **5(7)**: 565-575
- Filipović B, Bach-Rojecky L, Lacković Z (2010) Lasting reduction of postsurgical hyperalgesia after single injection of botulinum toxin type A in rat. *Fundam Clin Pharmacol* **24(1)**: 43-45
- Filipović B, Matak I, Bach-Rojecky L, Lacković Z (2012) Central action of peripherally applied botulinum toxin type A on pain and dural protein extravasation in rat model of trigeminal neuropathy. *PLoS One* **7(1)**: e29803
- Förster M, Mahn F, Gockel U, Brosz M, Freynhagen R, Tölle TR, Baron R (2013) Axial Low Back Pain: One Painful Area – Many Perceptions and Mechanisms. *PLoS One* **8(7)**: e68273
- Foster E, Wildner H, Tudeau L, Haueter S, Ralvenius WT, Jegen M, Johannssen H, Hösli L, Haenraets K, Ghanem A, Conzelmann KK, Bösl M, Zeilhofer HU (2015) Targeted ablation, silencing, and activation establish glycinergic dorsal horn neurons as key components of a spinal gate for pain and itch. *Neuron* **85(6)**: 1289-1304
- Freund B, Schwartz M (2003) Temporal relationship of muscle weakness and pain reduction in subjects treated with botulinum toxin A. *J Pain* **4(3)**: 159-165
- Fukushima T, Tsuda M, Kofuji T, Hori Y (2011) Physiological properties of enkephalin-containing neurons in the spinal dorsal horn visualized by expression of green fluorescent protein in BAC transgenic mice. *BMC Neurosci* **12**:36

- Gangadharan V, Kuner R (2013) Pain hypersensitivity mechanisms at a glance. *Dis Model Mech.* **6(4)**: 889-895
- Gao YJ, Ji RR (2009) c-Fos and pERK, which is a better marker for neuronal activation and central sensitization after noxious stimulation and tissue injury? *Open Pain J* **2**: 11-17
- Gao YJ, Ji RR (2010) Targeting astrocyte signaling for chronic pain. *Neurotherapeutics* **7**: 482-493
- Gazerani P, Staahl C, Drewes AM, Arendt-Nielsen L (2006) The effects of Botulinum Toxin type A on capsaicin-evoked pain, flare, and secondary hyperalgesia in an experimental human model of trigeminal sensitization. *Pain* **122(3)**: 315-325
- Gazerani P, Pedersen NS, Staahl C, Drewes AM, Arendt-Nielsen L (2009) Subcutaneous Botulinum toxin type A reduces capsaicin-induced trigeminal pain and vasomotor reactions in human skin. *Pain* **141(1-2)**: 60-69
- Gazerani P, Au S, Dong X, Kumar U, Arendt-Nielsen L, Cairns BE (2010) Botulinum neurotoxin type A (BoNTA) decreases the mechanical sensitivity of nociceptors and inhibits neurogenic vasodilation in a craniofacial muscle targeted for migraine prophylaxis. *Pain* **151(3)**: 606-616
- Gebhart GF (1995) Visceral nociception: consequences, modulation and the future. *Eur J Anaesthesiol Suppl* **10**: 24-27
- Gebhart GF (2004) Descending modulation of pain. *Neurosci Biobehav Rev* **27(8)**: 729-737
- Gebhart GF, Bielefeldt K (2008) Visceral pain. U: Bushnell AI, Kaneko A, Shepherd GM, Westheimer G (Ur.) *The Senses: A Comprehensive Reference Vol 5 Pain*. Academic Press, San Diego, 543-570
- Glattard E, Welters ID, Lavaux T, Muller AH, Laux A, Zhang D, Schmidt AR, Delalande F, Laventie BJ, Dirrig-Grosch S, Colin DA, Van Dorsselaer A, Aunis D, Metz-Boutigue MH, Schneider F, Goumonet Y (2010) Endogenous morphine levels are increased in sepsis: a partial implication of neutrophils. *PLoS One* **5(1)**: e8791
- Goldfarb AH, Jamurtas AZ (1997) Beta-endorphin response to exercise. An update. *Sports Med* **24(1)**: 8-16
- Grace PM, Hutchinson MR1, Maier SF2, Watkins LR (2014) Pathological pain and the neuroimmune interface. *Nat Rev Immunol* **14(4)**: 217-231
- Gu S, Jin R (2013) Assembly and function of the botulinum neurotoxin progenitor complex. *Curr Top Microbiol Immunol* **364**: 21-44
- Guo D, Hu J (2014) Spinal presynaptic inhibition in pain control. *Neuroscience* **283**: 95-106

- Gutala RV, Reddy PH (2004) The use of real-time PCR analysis in a gene expression study of Alzheimer's disease post-mortem brains. *J Neurosci Methods* **132(1)**: 101-107
- Habermann E (1974) 125I-labeled neurotoxin from Clostridium botulinum A: preparation, binding to synaptosomes and ascent to the spinal cord. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **281(1)**: 47-56
- Hanisch, UK (2013) Functional diversity of microglia -how heterogeneous are they to begin with? *Front Cell Neurosci* **7**: 65
- Harper CB, Martin S, Nguyen TH, Daniels SJ, Lavidis NA, Popoff MR, Hadzic G, Mariana A, Chau N, McCluskey A, Robinson PJ, Meunier FA (2011) Dynamin inhibition blocks botulinum neurotoxin type A endocytosis in neurons and delays botulism. *J Biol Chem* **286(41)**: 35966-35976
- Harvey RJ, Depner UB, Wässle H, Ahmadi S, Heindl C, Reinold H, Smart TG, Harvey K, Schütz B, Abo-Salem OM, Zimmer A, Poisbeau P, Welzl H, Wolfer DP, Betz H, Zeilhofer HU, Müller U (2004) GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science* **304(5672)**: 884-887
- He Y, Elias CL, Huang YC, Gao X, Leung YM, Kang Y, Xie H, Chaddock JA, Tsushima RG, Gaisano HY (2008) Botulinum neurotoxin A and neurotoxin E cleavage products of synaptosome-associated protein of 25 kd exhibit distinct actions on pancreatic islet beta-cell Kv2.1 channel gating. *Pancreas* **36(1)**: 10-17
- Hofer SB, Bonhoeffer T (2010) Dendritic spines: the stuff that memories are made of? *Curr Biol* **20(4)**: R157-159
- Holden JE, Jeong Y, Forrest JM (2005) The endogenous opioid system and clinical pain management. *AACN Clin Issues* **16(3)**: 291-301
- Hu Y, Guan X, Fan L, Li M, Liao Y, Nie Z, Jin L (2013) Therapeutic efficacy and safety of botulinum toxin type A in trigeminal neuralgia: a systematic review. *J Headache Pain* **14**: 72
- Hua S, Cabot PJ (2010) Mechanisms of peripheral immune-cell-mediated analgesia in inflammation: clinical and therapeutic implications. *Trends Pharmacol Sci* **31(9)**: 427-433
- Humm AM, Pabst C, Lauterburg T, Burgunder JM (2000) Enkephalin and aFGF are differentially regulated in rat spinal motoneurons after chemodenervation with botulinum toxin. *Exp Neurol* **161(1)**: 361-372
- Hunnskaar S, Hole K (1987) The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* **30(1)**: 103-114

- Intiso D (2012) Therapeutic use of botulinum toxin in neurorehabilitation. *J Toxicol* **2012**: 802893
- Ishikawa H, Mitsui Y, Yoshitomi T, Mashimo K, Aoki S, Mukuno K, Shimizu K (2000) Presynaptic effects of botulinum toxin type A on the neuronally evoked response of albino and pigmented rabbit iris sphincter and dilator muscles. *Jpn J Ophthalmol* **44(2)**: 106-109
- Jabbari B, Machado D (2011) Treatment of refractory pain with botulinum toxins--an evidence-based review. *Pain Med* **12(11)**: 1594-1606
- Jackson JL, Kuriyama A, Hayashino Y (2012) Botulinum toxin A for prophylactic treatment of migraine and tension headaches in adults: a meta-analysis. *JAMA* **307(16)**: 1736-1745
- Jancalek R (2011) Signaling mechanisms in mirror image pain pathogenesis. *Ann Neurosci* **18(3)**: 123–127
- Jankovic J (2004) Botulinum toxin in clinical practice. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **75**: 951–957
- Jarrett ME, Shulman RJ, Cain KC, Deechakawan W, Smith LT, Richebé P, Eugenio M, Heitkemper MM (2014) Conditioned pain modulation in women with irritable bowel syndrome. *Biol Res Nurs*. **16(4)**: 368-377
- Ji J, Tsuk S, Salapatek AM, Huang X, Chikvashvili D, Pasyk EA, Kang Y, Sheu L, Tsushima R, Diamant N, Trimble WS, Lotan I, Gaisano HY (2002) The 25-kDa synaptosome-associated protein (SNAP-25) binds and inhibits delayed rectifier potassium channels in secretory cells. *J Biol Chem* **277(23)**: 20195-20204
- Ji RR, Kohno T, Moore KA, Woolf CJ (2003) Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci* **26(12)**: 696-705
- Ji RR, Berta T, Nedergaard M (2013) Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy? *Pain* **154(01)**: S10-S28
- Julius D (2013) TRP channels and pain. *Annu Rev Cell Dev Biol* **29**: 355-384
- Julius D, Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* **413(6852)**:203-210.
- Jung HH, Lauterburg T, Burgunder JM (1997) Expression of neurotransmitter genes in rat spinal motoneurons after chemodenervation with botulinum toxin. *Neuroscience* **78(2)**: 469-479

- Kahle KT, Staley KJ, Nahed BV, Gamba G, Hebert SC, Lifton RP, Mount DB (2008) Roles of the cation-chloride cotransporters in neurological disease. *Nat Clin Pract Neurol* **4(9)**: 490-503
- Kalra A, Urban MO, Sluka KA (2001) Blockade of opioid receptors in rostral ventral medulla prevents antihyperalgesia produced by transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS). *J Pharmacol Exp Ther* **298(1)**: 257–263
- Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010) Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biol* **8(6)**: e1000412
- Kitamura Y, Matsuka Y, Spigelman I, Ishihara Y, Yamamoto Y, Sonoyama W, Kamioka H, Yamashiro T, Kuboki T, Oguma K (2009) Botulinum toxin type a (150 kDa) decreases exaggerated neurotransmitter release from trigeminal ganglion neurons and relieves neuropathy behaviors induced by infraorbital nerve constriction. *Neuroscience* **159(4)**: 1422-1429
- Kocher L (1988) Systemic naloxone does not affect pain-related behaviour in the formalin test in rat. *Physiol Behav* **43(3)**: 265-268
- Koltzenburg M, Wall PD, McMahon SB (1999) Does the right side know what the left is doing? *Trends Neurosci* **22(3)**: 122-127
- Konopka KH, Harbers M, Houghton A, Kortekaas R, van Vliet A, Timmerman W, den Boer JA, Struys MM, van Wijhe M (2012) Bilateral sensory abnormalities in patients with unilateral neuropathic pain; a quantitative sensory testing (QST) study. *PLoS One* **7(5)**: e37524
- Koster RM, Anderson M, De Beer EJ (1959) Acetic acid for analgesic screening. *Fed Proc* **18**: 412-418
- Krämer HH, Angerer C, Erbguth F, Schmelz M, Birklein F (2003) Botulinum Toxin A reduces neurogenic flare but has almost no effect on pain and hyperalgesia in human skin. *J Neurol* **250(2)**: 188-193
- Kumada A, Matsuka Y, Spigelman I, Maruhama K, Yamamoto Y, Neubert JK, Nolan TA, Watanabe K, Maekawa K, Kamioka H, Yamashiro T, Kuboki T, Oguma K (2012) Intradermal injection of Botulinum toxin type A alleviates infraorbital nerve constriction-induced thermal hyperalgesia in an operant assay. *J Oral Rehabil* **39(1)**: 63-72
- Kuner R (2010) Central mechanisms of pathological pain. *Nat Med* **16(11)**: 1258-1266

- Kuner R, Flor H (2017) Structural plasticity and reorganisation in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* **18**: 113
- Lacković Z, Filipović B, Matak I, Helyes Z (2016) Activity of botulinum toxin type A in cranial dura: implications for treatment of migraine and other headaches. *Br J Pharmacol* **173**(2): 279-291
- Langevin P, Peloso PM, Lowcock J, Nolan M, Weber J, Gross A, Roberts J, Goldsmith CH, Graham N, Burnie SJ, Haines T (2011) Botulinum toxin for subacute/chronic neck pain. *Cochrane Database Syst Rev* (7): CD008626
- Latremoliere A, Woolf CJ (2009) Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain* **10**(9): 895-926
- Lau CG, Takayasu Y, Rodenas-Ruano A, Paternain AV, Lerma J, Bennett MV, Zukin RS (2010) SNAP-25 is a target of protein kinase C phosphorylation critical to NMDA receptor trafficking. *J Neurosci* **30**(1): 242-254
- Lawrence GW, Ovsepian SV, Wang J, Aoki KR, Dolly JO (2012) Extravesicular intraneuronal migration of internalized botulinum neurotoxins without detectable inhibition of distal neurotransmission. *Biochem J* **441**(1): 443-452
- Lee WH, Shin TJ, Kim HJ, Lee JK, Suh HW, Lee SC, Seo K (2011) Intrathecal administration of botulinum neurotoxin type A attenuates formalin-induced nociceptive responses in mice. *Anesth Analg* **112**(1): 228-235
- Lin T, Li K, Zhang FY, Zhang ZK, Light AR, Fu KY (2007) Dissociation of spinal microglia morphological activation and peripheral inflammation in inflammatory pain models. *J Neuroimmunol* **192**(1-2): 40-48
- Lindenlaub T, Sommer C (2000) Partial sciatic nerve transection as a model of neuropathic pain: a qualitative and quantitative neuropathological study. *Pain* **89**(1): 97-106
- Lucioni A, Bales GT, Lotan TL, McGehee DS, Cook SP, Rapp DE (2008) Botulinum toxin type A inhibits sensory neuropeptide release in rat bladder models of acute injury and chronic inflammation. *BJU Int* **101**(3): 366-370
- Luisetto S, Marinelli S, Lucchetti F, Marchi F, Cobianchi S, Rossetto O, Montecucco C, Pavone F (2006) Botulinum neurotoxins and formalin-induced pain: central vs. peripheral effects in mice. *Brain Res* **1082**(1): 124-131
- Luisetto S, Marinelli S, Cobianchi S, Pavone F (2007) Anti-allodynic efficacy of botulinum neurotoxin A in a model of neuropathic pain. *Neuroscience* **145**(1): 1-4

- Luvisetto S, Vacca V, Cianchetti C (2015) Analgesic effects of botulinum neurotoxin type A in a model of allyl isothiocyanate- and capsaicin-induced pain in mice. *Toxicon* **94**: 23-28
- Marinelli S, Vacca V, Ricordy R, Ugenti C, Tata AM, Luvisetto S, Pavone F (2012) The analgesic effect on neuropathic pain of retrogradely transported botulinum neurotoxin A involves Schwann cells and astrocytes. *PLoS One* **7(10)**: e47977
- Marvizón JCG, Chen W, Murphy N (2009) Enkephalins, dynorphins and  $\beta$ -endorphin in the rat dorsal horn: an immunofluorescence colocalization study. *J Comp Neurol* **517(1)**: 51-68
- Masuyer G, Chaddock JA, Foster KA, Acharya KR (2014) Engineered botulinum neurotoxins as new therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **54**: 27-51
- Matak I, Bach-Rojecky L, Filipović B, Lacković Z (2011) Behavioral and immunohistochemical evidence for central antinociceptive activity of botulinum toxin A. *Neuroscience* **186**: 201-207
- Matak I, Riederer P, Lacković Z (2012) Botulinum toxin's axonal transport from periphery to the spinal cord. *Neurochem Int.* **61(2)**: 236-239
- Matak I, Lacković Z (2014) Botulinum toxin A, brain and pain. *Prog Neurobiol* **119-120**: 39-59
- Matak I, Rossetto O, Lacković Z (2014) Botulinum toxin type A selectivity for certain types of pain is associated with capsaicin-sensitive neurons. *Pain* **155(8)**: 1516-1526
- Matak I, Lacković Z (2015) Botulinum neurotoxin type A: Actions beyond SNAP-25? *Toxicology* **335**: 79-84
- Matteoli M, Pozzi D, Grumelli C, Condliffe SB, Frassoni C, Harkany T, Verderio C (2009) The synaptic split of SNAP-25: different roles in glutamatergic and GABAergic neurons? *Neuroscience* **158(1)**: 223-230
- McLellan K, Das RE, Ekong TA, Sesardic D (1996) Therapeutic botulinum type A toxin: factors affecting potency. *Toxicon* **34(9)**: 975-985
- McMahon HT, Foran P, Dolly JO, Verhage M, Wiegant VM, Nicholls DG (1992) Tetanus toxin and botulinum toxins type A and B inhibit glutamate, gamma-aminobutyric acid, aspartate, and met-enkephalin release from synaptosomes. Clues to the locus of action. *J Biol Chem* **267(30)**: 21338-21343
- Meeus M, Hermans L, Ickmans K, Struyf F, Van Cauwenbergh D, Bronckaerts L, De Clerck LS, Moorken G, Hans G, Grosemans S, Nijs J (2015) Endogenous pain modulation in response to exercise in patients with rheumatoid arthritis, patients with chronic fatigue

- syndrome and comorbid fibromyalgia, and healthy controls: a double-blind randomized controlled trial. *Pain Pract* **15(2)**: 98-106
- Melin C, Jacquot F, Dallel R, Artola A (2013) Segmental disinhibition suppresses C-fiber inputs to the rat superficial medullary dorsal horn via activation of GABA-B receptors. *Eur J Neurosci* **37**: 417–428
- Melzack R, Wall PD (1965) Pain mechanisms: a new theory. *Science* **150(3699)**: 971-979
- Meng J, Wang J, Lawrence G, Dolly JO (2007) Synaptobrevin I mediates exocytosis of CGRP from sensory neurons and inhibition by botulinum toxins reflects their antinociceptive potential. *J Cell Sci* **120(Pt 16)**: 2864-2874
- Mestre C, Pélissier T, Fialip J, Wilcox G, Eschalier A (1994) A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods* **32(4)**:197-200
- Meyer MC, Straughn AB, Lo MW, Schary WL, Whitney CC (1984) Bioequivalence, dose-proportionality, and pharmacokinetics of naltrexone after oral administration. *J Clin Psychiatry* **45 (9 Pt 2)**: 15-19
- Micov A, Tomić M, Popović B, Stepanović-Petrović R (2010) The antihyperalgesic effect of levetiracetam in an inflammatory model of pain in rats: mechanism of action. *Br J Pharmacol* **161(2)**: 384-392
- Mika J, Rojewska E, Makuch W, Korostynski M, Luvisetto S, Marinelli S, Pavone F, Przewlocka B (2011) The effect of botulinum neurotoxin A on sciatic nerve injury-induced neuroimmunological changes in rat dorsal root ganglia and spinal cord. *Neuroscience* **175**: 358-366
- Mika J, Zychowska M, Popiolek-Barczyk K, Rojewska E, Przewlocka B (2013) Importance of glial activation in neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* **716(1-3)**: 106-119
- Millan MJ (1999) The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* **57(1)**:1-164
- Milligan ED, Watkins LR (2009) Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* **10(1)**: 23-36
- Mirauccourt LS, Dallel R, Voisin DL (2007) Glycine Inhibitory Dysfunction Turns Touch into Pain through PKCgamma interneurons. *PLoS One* **2(11)**: e1116
- Moayedi M, Davis KD (2013) Theories of pain: from specificity to gate control. *J Neurophysiol* **109(1)**: 5-12
- Moore KA, Kohno T, Karchewski LA, Scholz J, Baba H, Woolf CJ (2002) Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J Neurosci* **22(15)**: 6724-6731



- Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, García-Sanz N, Ferrer-Montiel A (2004) Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. *J Biol Chem* **279(24)**: 25665-25672
- Morris JL, Jobling P, Gibbins IL (2002) Botulinum neurotoxin A attenuates release of norepinephrine but not NPY from vasoconstrictor neurons. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283(6)**: H2627-2635
- Muto Y, Sakai A, Sakamoto A, Suzuki H (2012) Activation of NK1 receptors in the locus coeruleus induces analgesia through noradrenergic-mediated descending inhibition in a rat model of neuropathic pain. *Br J Pharmacol* **166**: 1047-1057
- Nakov R, Habermann E, Hertting G, Wurster S, Allgaier C (1989) Effects of botulinum A toxin on presynaptic modulation of evoked transmitter release. *Eur J Pharmacol* **164(1)**: 45-53
- Ness TJ (1999) Models of Visceral Nociception. *ILAR J* **40(3)**:119-128
- Nirogi R, Kandikere V, Mudigonda K, Bhyrapuneni G, Muddana N, Saralaya R, Benade V (2009) A simple and rapid method to collect the cerebrospinal fluid of rats and its application for the assessment of drug penetration into the central nervous system. *J Neurosci Methods* **178(1)**: 116-119
- Noble EP, Wurtman RJ, Axelrod J (1967) A simple and rapid method for injecting H3-norepinephrine into the lateral ventricle of the rat brain. *Life Sci* **6(3)**: 281-291
- Oliveira ALR, Risling M, Negro A, Langone F, Cullheim S (2002) Apoptosis of spinal interneurons induced by sciatic nerve axotomy in the neonatal rat is counteracted by nerve growth factor and ciliary neurotrophic factor. *J Comp Neurol* **447**: 381-393
- Ossipov MH, Dussor GO, Porreca F (2010) Central modulation of pain. *J Clin Invest* **120(11)**: 3779-3787
- Ossipov MH, Morimura K, Porreca F (2014) Descending pain modulation and chronification of pain. *Curr Opin Support Palliat Care* **8(2)**: 143-151
- Palazzo E, Luongo L, de Novellis V, Rossi F, Maione S (2010) The role of cannabinoid receptors in the descending modulation of pain. *Pharmaceuticals (Basel)* **3(8)**: 2661-2673
- Parikh D, Hamid A, Friedman TC, Nguyen K, Tseng A, Marquez P, Lutfy K (2011) Stress-induced analgesia and endogenous opioid peptides: the importance of stress duration. *Eur J Pharmacol* **650(2-3)**: 563-567

- Park CK, Lü N, Xu ZZ, Liu T, Serhan CN, Ji RR (2011) Resolving TRPV1- and TNF- $\alpha$ -mediated spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain with neuroprotectin D1. *J Neurosci* **31**: 15072-15085
- Park HJ, Lee Y, Lee J, Park C, Moon DE (2006) The effects of botulinum toxin A on mechanical and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Can J Anaesth* **53(5)**: 470-477
- Prescott SA, Ma Q, De Koninck Y (2014) Normal and abnormal coding of somatosensory stimuli causing pain. *Nat Neurosci* **17(2)**: 183-191
- Purkiss J, Welch M, Doward S, Foster K (2000) Capsaicin-stimulated release of substance P from cultured dorsal root ganglion neurons: involvement of two distinct mechanisms. *Biochem Pharmacol* **59(11)**: 1403-1406
- Raboisson P, Dallel R (2004) The orofacial formalin test. *Neurosci Biobehav Rev* **28**: 219-226
- Radhakrishnan R, Moore SA, Sluka KA (2003) Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. *Pain* **104(3)**: 567-577
- Radhakrishnan R, Sluka KA (2009) Increased glutamate and decreased glycine release in the rostral ventromedial medulla during induction of a pre-clinical model of chronic widespread muscle pain. *Neurosci Lett* **457(3)**: 141-145
- Randall LO, Selitto JJ (1957) A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* **111(4)**: 409-419
- Rapp DE, Turk KW, Bales GT, Cook SP (2006) Botulinum toxin type a inhibits calcitonin gene-related peptide release from isolated rat bladder. *J Urol* **175(3 Pt 1)**: 1138-1142
- Ren K, Dubner R (1996) Enhanced descending modulation of nociception in rats with persistent hindpaw inflammation. *J Neurophysiol* **76(5)**: 3025-3037
- Restani L, Antonucci F, Gianfranceschi L, Rossi C, Rossetto O, Caleo M (2011) Evidence for anterograde transport and transcytosis of botulinum neurotoxin A (BoNT/A). *J Neurosci* **31(44)**: 15650-15659
- Restani L, Giribaldi F, Manich M, Bercsenyi K, Menendez G, Rossetto O, Caleo M, Schiavo G (2012) Botulinum neurotoxins A and E undergo retrograde axonal transport in primary motor neurons. *PLoS Pathog* **8(12)**: e1003087
- Robinson DR, Gebhart GF (2008) Inside information: the unique features of visceral sensation *Mol Interv* **8(5)**: 242-253
- Rossetto O, Pirazzini M, Montecucco C (2014) Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol* **12(8)**: 535-549

- Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, Billet S, Allchorne A, Poole S, Bonventre JV, Woolf CJ (2001) Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity *Nature* **410(6827)**: 471-475
- Sandkühler J (2009) Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol Rev* **89(2)**:707-758
- Sanoja R, Tortorici V, Fernandez C, Price TJ, Cervero F (2010) Role of RVM neurons in capsaicin-evoked visceral nociception and referred hyperalgesia. *Eur J Pain* **14(2)**: 120.e1-9
- Sawynok J. (2003) Topical and peripherally acting analgesics. *Pharmacol Rev* **55(1)**: 1-20
- Scaglione F (2016) Conversion Ratio between Botox®, Dysport®, and Xeomin® in Clinical Practice. *Toxins (Basel)* **8(3)**: pii: E65
- Schulte-Mattler WJ, Opatz O, Blersch W, May A, Bigalke H, Wohlfahrt K (2007) Botulinum toxin A does not alter capsaicin-induced pain perception in human skin. *J Neurol Sci* **260(1-2)**: 38-42
- Selak S, Paternain AV, Aller MI, Picó E, Rivera R, Lerma J (2009) A role for SNAP25 in internalization of kainate receptors and synaptic plasticity. *Neuron* **63(3)**: 357-371
- Sengupta JN (2009) Visceral pain: the neurophysiological mechanism. *Handb Exp Pharmacol.* **194**: 31-74
- Shenker N, Haigh R, Roberts E, Mapp P, Harris N, Blake D (2003) A review of contralateral responses to a unilateral inflammatory lesion. *Rheumatology* **42(11)**: 1279–1286
- Shimizu T, Shibata M, Toriumi H, Iwashita T, Funakubo M, Sato H, Kuroi T, Ebine T, Koizumi K, Suzuki N (2012) Reduction of TRPV1 expression in the trigeminal system by botulinum neurotoxin type-A. *Neurobiol Dis* **48(3)**: 367-378
- Shin MC, Yukihiro T, Ito Y, Akaike N (2013) Antinociceptive effects of A1 and A2 type botulinum toxins on carrageenan-induced hyperalgesia in rat. *Toxicon* **64**: v12-19
- Silberstein S, Mathew N, Saper J, Jenkins S, for the BOTOX Migraine Clinical Research Group (2000) Botulinum Toxin Type A as a Migraine Preventive Treatment. *Headache: The Journal of Head and Face Pain* **40**: 445–450
- Singh JA, Fitzgerald PM (2010) Botulinum toxin for shoulder pain. *Cochrane Database Syst Rev* **(9)**: CD008271
- Skyba DA, King EW, Sluka KA (2002) Effects of NMDA and nonNMDA ionotropic glutamate receptor antagonists on the development and maintenance of hyperalgesia induced by repeated intramuscular injection of acidic saline. *Pain* **98(1-2)**: 69-78

- Skyba DA, Lisi TL, Sluka KA (2005) Excitatory amino acid concentrations increase in the spinal cord dorsal horn after repeated intramuscular injection of acidic saline. *Pain* **119(1-3)**: 142-149
- Sluka KA, Kalra A, Moore SA (2001) Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. *Muscle Nerve* **24(1)**: 37-46
- Smith CP, Vemulakonda VM, Kiss S, Boone TB, Somogyi GT (2005) Enhanced ATP release from rat bladder urothelium during chronic bladder inflammation: effect of botulinum toxin A. *Neurochem Int* **47(4)**: 291-297
- Soares A, Andriolo RB, Atallah AN, da Silva EM (2012) Botulinum toxin for myofascial pain syndromes in adults. *Cochrane Database Syst Rev* **(4)**: CD007533
- Sobel J (2005). Botulism. *Clin Infect Dis* **41(8)**: 1167-1173
- Spike RC, Puskár Z, Andrew D, Todd AJ (2003) A quantitative and morphological study of projection neurons in lamina I of the rat lumbar spinal cord. *Eur J Neurosci* **18**: 2433-2448
- Stamford JA (1995) Descending control of pain. *Br J Anaesth* **75(2)**: 217-227
- Sugiura Y, Tonosaki Y (1995) Spinal organization of unmyelinated visceral afferent fibers in comparison with somatic afferent fibers. U: Gebhart CF (Ur.), Progress in Pain Research and Management. IASP Press, Seattle, 41-59
- Sycha T, Samal D, Chizh B, Lehr S, Gustorff B, Schnider P, Auff E (2006) A lack of antinociceptive or antiinflammatory effect of botulinum toxin A in an inflammatory human pain model. *Anesth Analg* **102(2)**: 509-516
- Tan AM, Stamboulian S, Chang YW, Zhao P, Hains AB, Waxman SG, Hains BC (2008) Neuropathic pain memory is maintained by Rac1-regulated dendritic spine remodeling after spinal cord injury. *J Neurosci* **28(49)**: 13173-13183
- Tang-Liu DD, Aoki KR, Dolly JO, de Paiva A, Houchen TL, Chasseaud LF, Webber C (2003) Intramuscular injection of 125I-botulinum neurotoxin-complex versus 125I-botulinum-free neurotoxin: time course of tissue distribution. *Toxicon* **42(5)**: 461-469
- Tillu DV, Gebhart GF, Sluka KA (2008) Descending facilitatory pathways from the RVM initiate and maintain bilateral hyperalgesia after muscle insult. *Pain* **136(3)**: 331-339
- Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K (1992) The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*. **51(1)**: 5-17
- Todd AJ (2002) Anatomy of primary afferents and projection neurones in the rat spinal dorsal horn with particular emphasis on substance P and the neurokinin 1 receptor. *Exp Physiol* **87(2)**: 245-249

- Tracey I, Mantyh PW (2007) The cerebral signature for pain perception and its modulation. *Neuron* **55(3)**: 377-391
- Traub RJ (2003) Sensitization in visceral pain and hyperalgesia. *Semin Pain Med* **1**:150-158
- Treede RD, Rief W, Barke A, Aziz Q, Bennett MI, Benoliel R, Cohen M, Evers S, Finnerup NB, First MB, Giamberardino MA, Kaasa S, Kosek E, Lavand'homme P, Nicholas M, Perrot S, Scholz J, Schug S, Smith BH, Svensson P, Vlaeyen JW, Wang SJ (2015) A classification of chronic pain for ICD-11. *Pain* **156(6)**: 1003-1007
- Tsai YC, Maditz R, Kuo CL, Fishman PS, Shoemaker CB, Oyler GA, Weissman AM (2010) Targeting botulinum neurotoxin persistence by the ubiquitin-proteasome system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107(38)**: 16554-16559
- Tsui JK, Eisen A, Stoessl AJ, Calne S, Calne DB (1986) Double-blind study of botulinum toxin in spasmodic torticollis. *Lancet* **2(8501)**: 245-247
- Tugnoli V, Capone JG, Eleopra R, Quatralo R, Sensi M, Gastaldo E, Tola MR, Geppetti P (2007) Botulinum toxin type A reduces capsaicin-evoked pain and neurogenic vasodilatation in human skin. *Pain* **130(1-2)**: 76-83
- Turk DC, Wilson HD, Cahana A (2011) Treatment of chronic non-cancer pain. *Lancet* **377(9784)**: 2226-2235
- Uçeyler N, Tschärke A, Sommer C (2007) Early cytokine expression in mouse sciatic nerve after chronic constriction nerve injury depends on calpain. *Brain Behav Immun* **21(5)**: 553-560
- Vacca V, Marinelli S, Eleuteri C, Luvisetto S, Pavone F (2012) Botulinum neurotoxin A enhances the analgesic effects on inflammatory pain and antagonizes tolerance induced by morphine in mice. *Brain Behav Immun* **26(3)**: 489-499
- Vacca V, Marinelli S, Luvisetto S, Pavone F (2013) Botulinum toxin A increases analgesic effects of morphine, counters development of morphine tolerance and modulates glia activation and  $\mu$  opioid receptor expression in neuropathic mice. *Brain Behav Immun* **32**: 40-50
- Vemulakonda VM, Somogyi GT, Kiss S, Salas NA, Boone TB, Smith CP (2005) Inhibitory effect of intravesically applied botulinum toxin A in chronic bladder inflammation. *J Urol* **173(2)**: 621-624
- Vanegas H, Schaible HG (2004) Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Res Brain Res Rev* **46(3)**: 295-309

- Verderio C, Grumelli C, Raiteri L, Coco S, Paluzzi S, Caccin P, Rossetto O, Bonanno G, Montecucco C, Matteoli M (2007) Traffic of botulinum toxins A and E in excitatory and inhibitory neurons. *Traffic* **8(2)**: 142-153
- Voller B, Sycha T, Gustorff B, Schmetterer L, Lehr S, Eichler HG, Auff E, Schnider P (2003) A randomized, double-blind, placebo controlled study on analgesic effects of botulinum toxin A. *Neurology* **61(7)**: 940-944
- Voscopoulos C, Lema M (2010) When does acute pain become chronic? *Br J Anaesth* **105 Suppl 1**: i69-85
- Waseem Z, Boulias C, Gordon A, Ismail F, Sheean G, Furlan AD (2011) Botulinum toxin injections for low-back pain and sciatica. *Cochrane Database Syst Rev* **(1)**: CD008257
- Wei H, Panula P, Pertovaara A (1998) A differential modulation of allodynia, hyperalgesia and nociception by neuropeptide FF in the periaqueductal gray of neuropathic rats: interactions with morphine and naloxone. *Neuroscience* **86(1)**: 311-319
- Welch MJ, Purkiss JR, Foster KA (2000) Sensitivity of embryonic rat dorsal root ganglia neurons to Clostridium botulinum neurotoxins. *Toxicon* **38(2)**: 245-258
- Wiegand H, Erdmann G, Wellhöner HH (1976) 125I-labelled botulinum A neurotoxin: pharmacokinetics in cats after intramuscular injection. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **292(2)**: 161-165
- Wiegand H, Wellhöner HH (1977) The action of botulinum A neurotoxin on the inhibition by antidromic stimulation of the lumbar monosynaptic reflex. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **298(3)**: 235-238
- Wilder-Smith CH, Robert-Yap J (2007) Abnormal endogenous pain modulation and somatic and visceral hypersensitivity in female patients with irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* **13(27)**: 3699-3704
- Wilder-Smith CH, Li X, Shen L, Cao Y, Ho KY, Wong RK (2014) Dysfunctional endogenous pain modulation in patients with functional dyspepsia. *Neurogastroenterol Motil* **26(4)**: 489-498
- Winer J, Jung CK, Shackel I, Williams PM (1999) Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem* **270**: 41-49
- Winocour S, Murad MH, Bidgoli-Moghaddam M, Jacobson SR, Bite U, Saint-Cyr M, Tran NV, Lemaine V (2014) A systematic review of the use of Botulinum toxin type A with subpectoral breast implants. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* **67(1)**: 34-41

- Woolf CJ (2004) Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Ann Intern Med* **140(6)**: 441-451
- Woolf CJ (2010) What is this thing called pain? *J Clin Invest* **120(11)**: 3742-3744
- Woolf CJ, Ma Q (2007) Nociceptors-noxious stimulus detectors. *Neuron* **55(3)**:353-364
- Wu J, Fang L, Lin Q, Willis WD (2001) Nitric oxide synthase in spinal cord central sensitization following intradermal injection of capsaicin. *Pain* **94(1)**: 47-58
- Wu HE, Hung KC, Mizoguchi H, Nagase H, Tseng LF (2002) Roles of endogenous opioid peptides in modulation of nocifensive response to formalin. *J Pharmacol Exp Ther* **300(2)**: 647-654
- Xiao L, Cheng J, Dai J, Zhang D (2011) Botulinum toxin decreases hyperalgesia and inhibits P2X3 receptor over-expression in sensory neurons induced by ventral root transection in rats. *Pain Med* **12(9)**: 1385-1394
- Xiao L, Cheng J, Zhuang Y, Qu W, Muir J, Liang H, Zhang D (2013) Botulinum toxin type A reduces hyperalgesia and TRPV1 expression in rats with neuropathic pain. *Pain Med* **14(2)**: 276-286
- Yamamoto T, Yaksh TL (1993) Effects of intrathecal strychnine and bicuculline on nerve compression-induced thermal hyperalgesia and selective antagonism by MK-801. *Pain* **54(1)**: 79-84
- Yang G, Pan F, Gan WB (2009) Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. *Nature* **462**: 920-924
- Yoo KY, Lee HS, Cho YK, Lim YS, Kim YS, Koo JH, Yoon SJ, Lee JH, Jang KH, Song SH (2014) Anti-inflammatory effects of botulinum toxin type a in a complete Freund's adjuvant-induced arthritic knee joint of hind leg on rat model. *Neurotox Res* **26(1)**: 32-39
- Zeilhofer HU, Wildner H, Yévenes GE (2012) Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. *Physiol Rev* **92(1)**: 193-235
- Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals. *Pain* **16**: 109-110
- Zubieta JK, Bueller JA, Jackson LR, Scott DJ, Xu Y, Koeppe RA, Nichols TE, Stohler CS (2005) Placebo effects mediated by endogenous opioid activity on mu-opioid receptors. *J Neurosci* **25(34)**: 7754-7762

## **8 PRILOZI**



Ovaj dodatak sadrži četiri znanstvena rada objavljena u časopisima zastupljenim u bazama Current Contents koji obrađuju problematiku iznesenu u ovom doktorskom radu:

- 1- Drinovac V, Bach-Rojecky L, Matak I, Lacković Z (2013) Involvement of  $\mu$ -opioid receptors in antinociceptive action of botulinum toxin type A. *Neuropharmacology* **70**: 331-337
- 2- Drinovac V, Bach-Rojecky L, Lacković Z (2014) Association of antinociceptive action of botulinum toxin type A with GABA-A receptor. *J Neural Transm (Vienna)* **121(6)**: 665-669
- 3- Drinovac V, Bach-Rojecky L, Babić A, Lacković Z (2014) Antinociceptive effect of botulinum toxin type A on experimental abdominal pain. *Eur J Pharmacol* **745**: 190-195
- 4- Drinovac Vlah V, Bach-Rojecky L, Lacković Z (2016) Antinociceptive action of botulinum toxin type A in carrageenan-induced mirror pain. *J Neural Transm (Vienna)* **123(12)**: 1403-1413

# PRILOG I

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



## Involvement of $\mu$ -opioid receptors in antinociceptive action of botulinum toxin type A

V. Drinovac<sup>a</sup>, L. Bach-Rojecky<sup>a</sup>, I. Matak<sup>b</sup>, Z. Lacković<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacology, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

<sup>b</sup> Laboratory of Molecular Neuropharmacology, Department of Pharmacology and Croatian Brain Research Institute, University of Zagreb School of Medicine, Šalata 11, 10000 Zagreb, Croatia

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 16 October 2012

Received in revised form

8 January 2013

Accepted 8 February 2013

#### Keywords:

Botulinum toxin A

Opioid antagonist

$\mu$ -Opioid receptors

Formalin test

Peripheral neuropathy

c-Fos

### ABSTRACT

Botulinum toxin A (BTX-A) is approved for treatment of chronic migraine and has been investigated in various other painful conditions. Recent evidence demonstrated retrograde axonal transport and suggested the involvement of CNS in antinociceptive effect of BTX-A. However, the mechanism of BTX-A central antinociceptive action is unknown. In this study we investigated the potential role of opioid receptors in BTX-A's antinociceptive activity.

In formalin-induced inflammatory pain we assessed the effect of opioid antagonists on antinociceptive activity of BTX-A. Naltrexone was injected subcutaneously (0.02–2 mg/kg) or intrathecally (0.07  $\mu$ g/10  $\mu$ l–350  $\mu$ g/10  $\mu$ l), while selective  $\mu$ -antagonist naloxonazine was administered intraperitoneally (5 mg/kg) prior to nociceptive testing. The influence of naltrexone (2 mg/kg s.c.) on BTX-A antinociceptive activity was examined additionally in an experimental neuropathy induced by partial sciatic nerve transection. To investigate the effects of naltrexone and BTX-A on neuronal activation in spinal cord, c-Fos expression was immunohistochemically examined in a model of formalin-induced pain.

Antinociceptive effects of BTX-A in formalin and sciatic nerve transection-induced pain were prevented by non-selective opioid antagonist naltrexone. Similarly, BTX-A-induced pain reduction was abolished by low dose of intrathecal naltrexone and by selective  $\mu$ -antagonist naloxonazine. BTX-A-induced decrease in dorsal horn c-Fos expression was prevented by naltrexone.

Prevention of BTX-A effects on pain and c-Fos expression by opioid antagonists suggest that the central antinociceptive action of BTX-A might be associated with the activity of endogenous opioid system (involving  $\mu$ -opioid receptor). These results provide first insights into the mechanism of BTX-A's central antinociceptive activity.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Botulinum toxin type A (BTX-A), an endopeptidase derived from *Clostridium botulinum*, cleaves SNAP-25 (Synaptosomal Associated Protein of 25 kDa), one of the proteins essential for neuroexocytosis (Blasi et al., 1993). Prevention of acetylcholine release in neuromuscular junction and autonomous synapses is the main feature of BTX-A poisoning. The same mechanism enables local application of BTX-A in low picomolar doses to be used in treatment of neuromuscular and autonomous disorders (Lim and Seet, 2010).

**Abbreviations:** BTX-A, botulinum toxin type A; SNAP-25, Synaptosomal Associated Protein of 25 kDa; i.pl., intraplantarly; s.c., subcutaneously; i.t., intrathecally; i.p., intraperitoneally; PBS, phosphate-buffered saline; PBST, Triton X-100 in phosphate-buffered saline; NGS, normal goat serum.

\* Corresponding author. Tel./fax: +385 1 45 66 843.

E-mail addresses: [vdrinovac@pharma.hr](mailto:vdrinovac@pharma.hr) (V. Drinovac), [lbach@pharma.hr](mailto:lbach@pharma.hr) (L. Bach-Rojecky), [ivica.matak@mef.hr](mailto:ivica.matak@mef.hr) (I. Matak), [lac@mef.hr](mailto:lac@mef.hr) (Z. Lacković).

Apart from its effect on neuromuscular junction, recent pre-clinical and clinical studies reported the efficacy of BTX-A in reduction of allodynia and hyperalgesia in pain of different origins (Jabbari and Machado, 2011; Pavone and Luvisetto, 2010). Moreover, BTX-A was recently registered for treatment of chronic migraine (Dodick et al., 2010) and several controlled clinical studies in other painful conditions are in progress (Jabbari and Machado, 2011; Singh, 2010). Importance of BTX-A application in clinical practice results from its unique ability to reduce pain in a long lasting manner (up to 6 months in humans).

It was suggested that antinociceptive effect of BTX-A results from inhibition of neurotransmitter release from peripheral sensory nerve endings (Aoki, 2005; Cui et al., 2004), similarly as in neuromuscular junction. On the other hand, recent behavioral (Bach-Rojecky and Lacković, 2009; Bach-Rojecky et al., 2010; Favre-Guilmond et al., 2009; Filipovic et al., 2012) and immunohistochemical studies (Matak et al., 2011, 2012) indicate that the

antinociceptive action occurs primarily in the central nervous system where BTX-A is axonally transported (Antonucci et al., 2008; Matak et al., 2011, 2012). However, there are no *in vivo* data regarding central molecular mechanism, receptors and possible neurotransmitters involved. Here we report that the antinociceptive action of BTX-A is associated with central  $\mu$ -opioid receptor activity.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Male Wistar rats (University of Zagreb School of Medicine, Croatia) weighing 300–400 g, kept in temperature-regulated environment (23 °C) under 12 h light–dark cycle, with free access to food and water (except during testing), were used in all experiments. Experiments were conducted according to the European Communities Council Directive (86/609/EEC) and recommendations of the International Association for the Study of Pain (Zimmerman, 1983). All efforts were made to reduce the number of animals used and to reduce their suffering. Experiments were approved by the Ethical Committee of the University of Zagreb, School of Medicine (permit No. 07-76/2005-43).

### 2.2. Drugs

The following drugs and chemicals were used: BTX-A (Botox<sup>®</sup>, Allergan, Inc., Irvine, USA); non-selective opioid antagonist naltrexone (Sigma, St. Louis, MO, USA); selective  $\mu$ -opioid antagonist naloxonazine (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA); chloral-hydrate (Sigma, St. Louis, MO, USA); diethyl ether (Sigma, St. Louis, MO, USA); acetone (Sigma, St. Louis, MO, USA). To obtain the doses needed, BTX-A and opioid antagonists were dissolved in 0.9% saline. Each vial of Botox<sup>®</sup> contains 100 U (~4.8 ng) of purified *C. botulinum* type A neurotoxin complex.

For immunohistochemical experiment the following chemicals are used: paraformaldehyde (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), Triton X-100 (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), normal goat serum (Vector, Inc., Burlingame, CA, USA), c-Fos rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA), goat anti-rabbit Alexa Fluor-448 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), anti-fading agent (Fluorogel, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA).

### 2.3. Animal treatment

BTX-A was injected subcutaneously into the plantar surface of the hind paw (intraplantarily, i.p.), ipsilaterally to formalin injection/nerve injury, to conscious, gently restrained rats, in a volume of 20  $\mu$ l with a 27½ gauge needle. To test the effect on formalin-induced pain, BTX-A was injected in a dose of 5 U/kg, while 7 U/kg BTX-A was used in the model of neuropathic pain. Doses were chosen based on previous experiments from our laboratory (Bach-Rojecky et al., 2005; Bach-Rojecky and Lacković, 2005).

Naltrexone was injected: 1. subcutaneously (s.c., 0.02 mg/kg–2 mg/kg) into the abdominal area in a volume of 250  $\mu$ l; and 2. intrathecally (i.t., 0.07  $\mu$ g/10  $\mu$ l–350  $\mu$ g/10  $\mu$ l) at the lumbar L3–L4 level. Dose of s.c. injected naltrexone was chosen based on literature (Correa et al., 2010), while dose of i.t. naltrexone (100-fold lower than s.c. dose) was based on preliminary experiment. 1 ml of naloxonazine was injected intraperitoneally (i.p.) in a dose of 5 mg/kg, as used by other authors (De Freitas et al., 2011).

### 2.4. Nociceptive assessment

Nociceptive experiments were performed in a quiet laboratory, between 10 a.m. and 4 p.m. Animals were allowed to accommodate to the testing environment for 10 min. Evaluation of nociceptive testing was performed by observer unaware of the animal treatment. Animal treatment was known to other experimenter who treated and marked the animals. However, the main observer could recognize the injured hind-limb either in formalin-induced pain (paw edema) or nerve injury (limping and characteristic posture of injured paw).

#### 2.4.1. Formalin test

Conscious, gently restrained rats were s.c. injected with saline-diluted 5% formalin solution (50  $\mu$ l) into the plantar side of the right hind paw pad and immediately returned to the transparent cage for 1 h observation period. Pain was measured as the number of nocifensive behaviors (licking, flinching and shaking of the injected paw). Recording time was divided in two phases: acute phase I (0–15 min) response caused by direct stimulation of peripheral sensory nerve endings with formalin, and inflammatory phase II (15–60 min) characterized by peripheral sensitization (Tjølsen et al., 1992). Each experimental group contained 5–6 animals.

BTX-A (5 U/kg i.p.) was injected 5 days before the formalin testing, while naltrexone (0.02 mg/kg–2 mg/kg s.c.; 0.07  $\mu$ g/ $\mu$ l–350  $\mu$ g/ $\mu$ l i.t.) and naloxonazine

(5 mg/kg i.p.) were injected 40 min and 24 h prior to the formalin test, respectively. Control animals received 0.9% saline in the appropriate volumes. For intrathecal application of naltrexone, animals were briefly anesthetized with diethyl ether until no reflexive response to paw pinch was elicited. Animal's hair was shaved at the lumbar L3–L4 level. Small skin incision (1 cm) was performed. Naltrexone or saline were injected between the vertebrae. Animals recovered from diethyl ether anesthesia in approx. 10 min. Shortly acting diethyl ether was used to achieve fast recovery prior to nociceptive testing (40 min following i.t. injection).

To investigate whether the effect of naltrexone on BTX-A-induced antinociception is short-lasting or long-lasting, we performed an additional experiment where naltrexone was administered 24 h prior to formalin testing. 24 h point was chosen based on the time required for complete elimination of naltrexone from the organism (Verebey et al., 1976).

#### 2.4.2. Peripheral neuropathy

A total number of 38 rats underwent sciatic nerve partial transection, as previously described (Bach-Rojecky et al., 2005; Lindenlaub and Sommer, 2000). In brief, right sciatic nerve was exposed in rats under general anesthesia (chloral-hydrate 300 mg/kg) and the middle of the nerve trunk was pierced using a thin surgical needle. Half of the nerve diameter was transected by the scalpel in the needle direction. Six rats were subjected to sham procedure; sciatic nerve was exposed, but not transected. Six naive rats served as control.

Two weeks following the peripheral nerve injury, animals which developed mechanical sensitivity to pressure/von Frey filaments and cold allodynia (at least 20% changes from the mean of the sham-operated group) were included into the further experiment. Animals were divided in four groups (5–6 animals per group) as follows: (1) 0.9% saline (i.p.), (2) BTX-A (7 U/kg; i.p.), (3) naltrexone (2 mg/kg, s.c.), (4) BTX-A + naltrexone.

Nociceptive measurements were performed 5 days following BTX-A i.p. injection, and 40 min following naltrexone s.c. injection. The assessment of each animal started with mechanical sensitivity to pressure, followed by mechanical sensitivity to von Frey filaments and cold allodynia measurements, with 30 min period between each type of measurement.

**2.4.2.1. Mechanical sensitivity to paw pressure.** Mechanical sensitivity was measured by the modified paw pressure test, originally described by Randall and Selitto (1957), on both hind paws. Average mechanical nociceptive threshold expressed in grams was calculated from 3 measurements. Measurements were repeated in 10 min intervals by applying increased pressure to the dorsal surface until paw withdrawal or struggling of the animal occurred (Bach-Rojecky et al., 2010).

**2.4.2.2. Mechanical sensitivity to von Frey filaments.** Paw withdrawal threshold in response to a mechanical stimulus was determined using a series of von Frey filaments (Stoelting Co, Wood Dale, IL, USA) ranging from 0.6 g to 26 g. Animals were placed in a plastic cage with a metal mesh floor 10 min prior to testing. Von Frey filaments were applied to the mid-plantar surface of the hind paw through the mesh floor. Each filament was applied 3 times, kept in bent position on the rat's hind paw for 4 s. Filaments were applied in ascending order, and the lowest filament that elicited a foot withdrawal response was considered the threshold stimulus (Wei et al., 1998).

**2.4.2.3. Cold allodynia.** Cold allodynia was measured as the number of foot withdrawal responses after an application of cold stimuli (a drop of 100% acetone) to the plantar surface of the hind paw. Testing was repeated five times with an interval of approximately 5 min between each test. Response frequency to acetone was expressed as a percent withdrawal frequency [(number of paw withdrawals/number of trials)  $\times$  100] (Park et al., 2006).

### 2.5. Immunohistochemistry

Immunohistochemical analysis was performed on samples collected from the formalin test experiment with s.c. applied naltrexone.

Two hours following the i.p. formalin injection rats were deeply anesthetized using chloral-hydrate (300 mg/kg) and transcardially perfused with 250 ml of 0.9% saline, followed by 250 ml of fixative (4% paraformaldehyde in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4). Spinal cord was removed and cryoprotected at 4 °C overnight in 15% sucrose-fixative solution, followed by 30% sucrose in PBS the next day, until the tissue sank. Lumbar spinal cord (L4/L5 segment) sections of 4 rats belonging to each experimental group were processed for immunohistochemical analysis. Frozen sections (30  $\mu$ m), cut on cryostat (Leica, Germany), were taken for free floating in wells with PBS. Sections were washed 3  $\times$  5 min in PBST (PBS + 0.25% Triton X-100) blocked in 10% normal goat serum (NGS) for 1 h and incubated overnight at room temperature with rabbit anti-c-Fos polyclonal antibody diluted in 1% NGS. Sections were washed in PBST and incubated for 2 h at room temperature with 1:400 goat anti-rabbit Alexa Fluor-448 fluorescent secondary antibody in the dark, diluted in 1% NGS. Sections were washed and mounted on glass slides with anti-fading agent.

Sections were visualized with fluorescent microscope (Olympus BX51, Olympus, Tokyo, Japan) connected to digital camera (Olympus DP-70, Olympus, Tokyo, Japan)



and photographed using 10× and 40× magnification. C-Fos-positive neurons were counted in sensory laminae of the spinal cord dorsal horn (I to VI) by experimenter unaware of the treatment groups. Average number of c-Fos-positive neurons for each animal was calculated from three randomly selected sections. Figures were assembled using Microsoft Paint and processed for brightness and contrast using Adobe Photoshop.

### 2.6. Statistical analysis

Results, presented as mean ± SEM, were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman–Keuls post hoc test.  $P < 0.05$  was considered significant.

## 3. Results

### 3.1. Opioid antagonists abolish the antinociceptive effect of BTX-A during phase II of the formalin test

#### 3.1.1. Systemically applied naltrexone inhibits the antinociceptive effect of BTX-A during phase II of the formalin test

Peripheral BTX-A pre-treatment (5 U/kg, i.pl.) significantly reduced the number of licking/flinching during second phase of formalin-induced pain ( $p < 0.001$ ). Naltrexone (2 mg/kg s.c.), applied 40 min prior to formalin test, abolished the antinociceptive effect of BTX-A ( $p < 0.001$ , Fig. 1A). Additionally, formalin test was performed 24 h after naltrexone (2 mg/kg) s.c. injection to investigate whether naltrexone interferes with antinociceptive effect of BTX-A only shortly (until eliminated from the organism), or it has long-lasting reducing effect on BTX-A antinociceptive action. Naltrexone had no effect on BTX-A induced antinociception in this experiment (Fig. 1A). Naltrexone alone did not influence formalin-induced pain (Fig. 1A).

#### 3.1.2. Centrally applied low dose naltrexone reduces antinociceptive effect of peripheral BTX-A

To examine the possible central site of naltrexone action on BTX-A induced antinociception, low dose-naltrexone (7 µg/10 µl) was injected intrathecally. Similarly to 100-fold higher systemic dose (2 mg/kg), it abolished the antinociceptive effect of peripherally applied BTX-A ( $p < 0.01$ ; Fig. 1B). However, the same low dose of naltrexone applied s.c. (7 µg/10 µl) did not influence BTX-A antinociceptive effect (Fig. 1B).

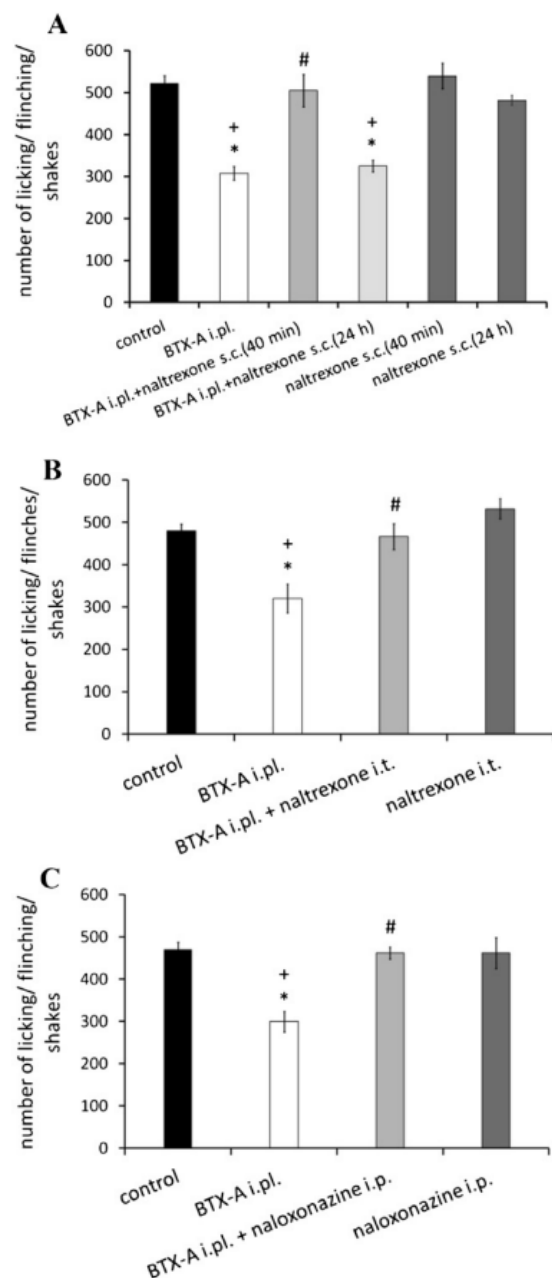
#### 3.1.3. Antinociceptive action of BTX-A is dependent on µ-opioid receptor

Single i.p. injection of selective µ-opioid antagonist naloxonazine (5 mg/kg) applied 24 h before the test abolished the antinociceptive effect of BTX-A in phase II of formalin test ( $p < 0.01$ ; Fig. 1C). Naloxonazine alone did not alter formalin-evoked licking and flinching of the injected paw (Fig. 1C).

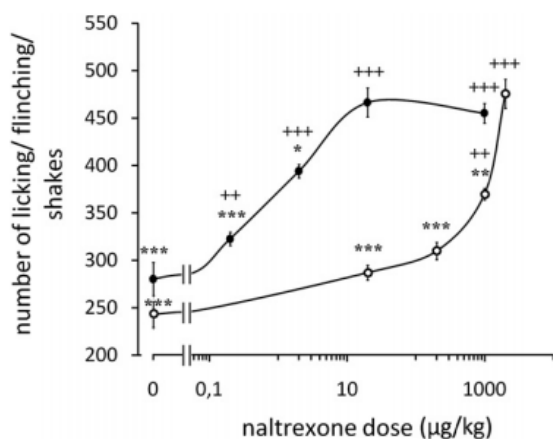
### 3.2. Systemic and central naltrexone dose-dependently prevents the antinociceptive effect of BTX-A

Naltrexone dose-dependently decreased the antinociceptive effect of BTX-A (5 U/kg i.pl.) in the second phase of the formalin test (Fig. 2). The highest tested doses of naltrexone (2 mg/kg s.c. or 350 µg/10 µl i.t.) had maximal effect on prevention of BTX-A antinociceptive effect ( $p < 0.001$ ). A decrease in preventing the antinociceptive effect of BTX-A was found with lowering naltrexone dose (Fig. 2).

The highest tested doses of naltrexone alone (10 mg/kg s.c., and 350 µg/10 µl i.t.) had no significant influence on formalin-induced pain (number of nocifensive behaviors:  $454.6 \pm 20.7$  vs. saline s.c.:  $489.8 \pm 15.2$  and  $485.8 \pm 16.4$  vs. saline i.t.:  $494 \pm 22.7$ ). Accordingly, lower doses of naltrexone alone (2 mg/kg s.c.; 0.7 µg/10 µl and 0.07 µg/10 µl i.t.) had no significant influence on formalin-induced pain, as well (results not shown).



**Fig. 1.** Effects of opioid antagonists, naltrexone and naloxonazine, on antinociceptive effect of BTX-A in the second phase of the formalin test. Measurements were performed 5 days after BTX-A (5 U/kg) i.pl. injection and: A) 40 min or 24 h after naltrexone (2 mg/kg) s.c. injection; B) 40 min after naltrexone (7 µg/10 µl i.t.) i.t. injection (control group intrathecally injected with saline); C) 24 h after naloxonazine (5 mg/kg) i.p. injection. Animals were treated with naltrexone or naloxonazine 5 days after BTX-A (5 U/kg) i.pl. injection. A) Naltrexone administered 40 min prior to formalin test blocks antinociceptive effect of BTX-A, while naltrexone administered 24 h prior to formalin test has no effect on antinociceptive action of BTX-A. Mean ± SEM,  $n = 5-6$ , \*  $p < 0.001$  compared to control, +  $p < 0.001$  compared to naltrexone (40 min) and naltrexone (24 h), #  $p < 0.01$  compared to BTX; B) Low dose of intrathecal naltrexone prevents BTX-A antinociceptive action in formalin-induced pain. Mean ± SEM,  $n = 5$ , \*  $p < 0.01$  compared to control; +  $p < 0.001$  compared to naltrexone; #  $p < 0.01$  compared to BTX; C) Selective µ-opioid antagonist naloxonazine reverses the antinociceptive action of BTX-A. Mean ± SEM,  $n = 6$ ; \*  $p < 0.005$  compared to control; +  $p < 0.01$  compared to naloxonazine; #  $p < 0.01$  compared to BTX-A (Newman–Keuls post hoc).



**Fig. 2.** Naltrexone dose–response: the effect of different doses of naltrexone injected systemically or intrathecally on antinociceptive effect of peripheral BTX-A in the second phase of the formalin test. Measurements were performed 5 days after BTX-A (5 U/kg) i.p.l. injection and 40 min after naltrexone 2 mg/kg, 1 mg/kg, 0.2 mg/kg and 0.02 mg/kg s.c. injection or 350 µg/10 µl, 7 µg/10 µl, 0.7 µg/10 µl and 0.07 µg/10 µl i.t. injection (in graph, all doses are shown as (µg/kg)). Zero value represents BTX-A alone. Note the log-scale on x-axis. Mean ± SEM,  $n = 5$ ; ○ Naltrexone subcutaneous: \*\* –  $p < 0.01$  compared to control, \*\*\* –  $p < 0.001$  compared to control, ++ –  $p < 0.01$  compared to BTX-A, +++ –  $p < 0.001$  compared to BTX-A; ● Naltrexone intrathecal: \* –  $p < 0.05$  compared to control, \*\* –  $p < 0.01$  compared to control, \*\*\* –  $p < 0.001$  compared to control; ++ –  $p < 0.01$  compared to BTX-A, +++ –  $p < 0.001$  compared to BTX-A (Newman–Keuls post hoc).

### 3.3. Opioid antagonist reduces the antinociceptive effect of BTX-A in experimental neuropathic pain

Two weeks following the partial sciatic nerve transection 60% of rats developed mechanical sensitivity and cold allodynia ipsilateral to the nerve injury. A single i.p.l. BTX-A (7 U/kg) injection significantly decreased mechanical sensitivity to pressure and von Frey filaments, as well as cold allodynia (Fig. 3).

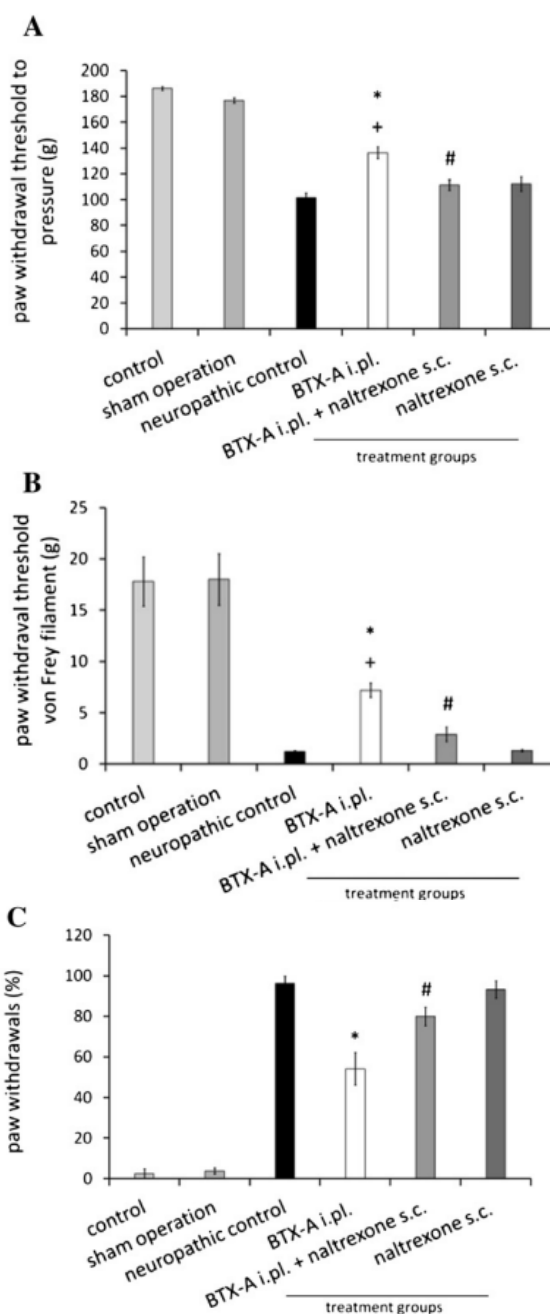
Naltrexone (2 mg/kg, s.c.) applied 5 days after BTX-A injection reversed the antinociceptive effect of BTX-A on mechanical sensitivity to pressure (Fig. 3A), and reduced its effects on mechanical sensitivity to von Frey filaments and cold allodynia (Fig. 3B and C). All measurements were conducted starting from 40 min after naltrexone injection. Naltrexone alone did not alter the pain in all nociceptive tests.

### 3.4. Naltrexone prevents the effect of BTX-A on c-Fos expression in dorsal horn of the spinal cord

Behavioral changes in previously described experiment were accompanied by changes of c-Fos protein expression (Fig. 4) in the dorsal horn in a similar fashion. The number of c-Fos positive neurons was significantly reduced ( $p < 0.05$ , Fig. 4B) in BTX-A treated animals compared to control (saline + formalin) group. Naltrexone prevented the effect of BTX-A on c-Fos expression in formalin test ( $p < 0.05$ , Fig. 4B).

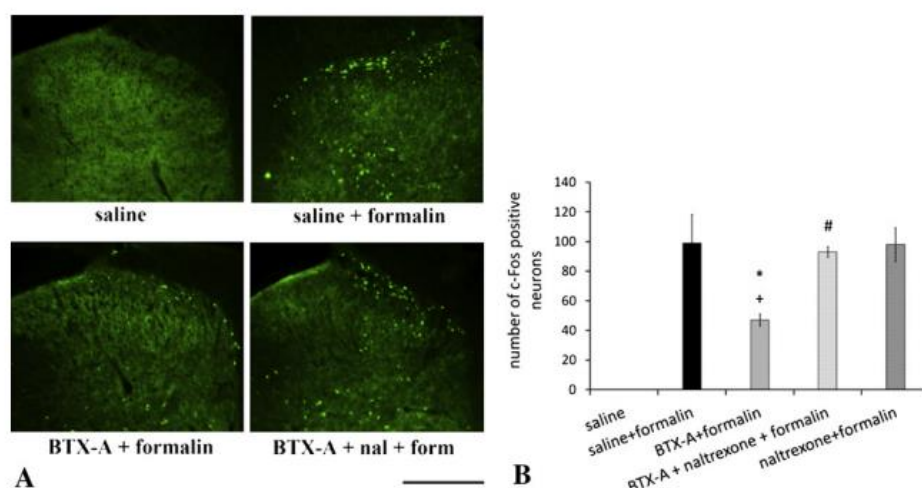
## 4. Discussion

According to textbook description, BTX-A does not enter CNS and its therapeutic, as well as toxic effects, are associated with peripheral nerve endings only. However, the antinociceptive effect of BTX-A cannot be explained without assumption that it is centrally mediated. This is demonstrated by numerous behavioral evidence such as: bilateral effect following unilateral toxin injection



**Fig. 3.** Systemic application of naltrexone reduces the antinociceptive effect of BTX-A in the experimental neuropathic model induced by partial sciatic nerve transection. Nociceptive tests were performed 5 days following BTX-A (7 U/kg, i.p.l.) and 40 min following naltrexone (2 mg/kg, s.c.) application in animals with developed neuropathy. Neuropathy developed ipsilaterally (at the site of the transected nerve). A) Mechanical sensitivity measured with paw pressure test; results expressed in grams. Mean ± SEM,  $n = 5-6$ ; \* –  $p < 0.0001$  compared to neuropathic control; + –  $p < 0.005$  compared to naltrexone; # –  $p < 0.001$  compared to BTX-A (Newman–Keuls post hoc). B) Mechanical sensitivity measured with von Frey filaments; results expressed in grams. Mean ± SEM,  $n = 5-6$ ; \* –  $p < 0.05$  compared to neuropathic control; + –  $p < 0.05$  compared to naltrexone; # –  $p < 0.05$  compared to BTX-A (Newman–Keuls post hoc). C) Cold allodynia; results expressed as percentage of paw withdrawals caused by drop of 100% acetone. Mean ± SEM,  $n = 5-6$ ; \* –  $p < 0.0005$  compared to neuropathic control and naltrexone; # –  $p < 0.0005$  compared to BTX-A (Newman–Keuls post hoc).





**Fig. 4.** A) Expression of immunofluorescently labeled c-Fos (green punctate immunoreactivity) in the ipsilateral (to the site of formalin-injection) superficial laminae of the L4/L5 spinal cord sections. Representative examples of 10× magnification images. Experimental groups: saline; saline + formalin; BTX-A (5 U/kg, s.c.) + formalin; BTX-A (5 U/kg s.c.) + naltrexone (2 mg/kg, s.c.) + formalin. Scale bar: 200 μm. B) Quantitative analysis of c-Fos expression in sensory laminae of the spinal cord sections from 10× magnification images. Total number of c-Fos positive neurons in sensory laminae in different formalin-treated experimental groups: saline; BTX-A; BTX-A + naltrexone; naltrexone. Average number of c-Fos positive neurons for each animal was calculated from three spinal cord sections. Mean ± SEM, n = 4; \* – p < 0.05 compared to control (saline); + – p < 0.05 compared to naltrexone; # – p < 0.05 compared to BTX-A (Newman–Keuls post hoc). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

in different bilateral or polyneuropathic pain models, prevention of antinociceptive effect by axonal transport blocker colchicine, effect on contralateral side after injection to distally cut sciatic nerve (Bach-Rojecky and Lacković, 2005, 2009; Bach-Rojecky et al., 2010; Favre-Guilmand et al., 2009; Filipovic et al., 2012; Matak et al., 2011). Moreover, using antibody specific for BTX-A-cleaved SNAP-25, Caleo and co-workers (Antonucci et al., 2008; Restani et al., 2012) discovered axonal and transynaptic transport of BTX-A inside the brain, and from periphery to the facial motor nucleus, while our group discovered the axonal transport of BTX-A within sensory neurons projecting from periphery to the brainstem (trigeminal sensory nuclei) or spinal cord (corresponding segment of dorsal horn). In our experiments, axonal transport blocker colchicine prevented the antinociceptive activity of BTX-A, as well as central SNAP-25 cleavage (Matak et al., 2011, 2012), suggesting that toxin's retrograde axonal transport to CNS is necessary for the antinociceptive activity.

Up to now, the mechanism of BTX-A antinociceptive action in the CNS is unknown. Since SNAP-25 is believed to be the main target of BTX-A, it could be assumed that, in sensory areas of CNS, BTX-A directly or indirectly affects central neurotransmitters involved in pain processing. But, up to now, there are no studies specifically examining this issue *in vivo*. Few previous observations (Auguet et al., 2008; Vacca et al., 2012.) discovered synergistic effect of BTX-A and morphine, thus, indirectly suggested the association between opioid system and BTX-A. Therefore, we investigated if the central antinociceptive activity of BTX-A is associated with the endogenous opioid system, since opioids play a pivotal role in control of nociception and they are one of the most studied innate pain-relieving systems (Holden et al., 2005).

We tested the effects of selective and non-selective opioid antagonists on antinociceptive action of BTX-A in two different types of pain: formalin-induced inflammatory pain and partial sciatic nerve transection-induced neuropathic pain.

In the present study a non-selective opioid receptor antagonist naltrexone (2 mg/kg s.c.), as well as selective μ-opioid antagonist naloxonazine (5 mg/kg i.p.), prevented the antinociceptive effect of

peripheral BTX-A on second inflammatory phase of the formalin test (Fig. 1). To exclude the possibility that opioid antagonists increase pain by a mechanism independent from the BTX-A effect, dose–response experiment was preformed (Fig. 2). Moreover, lower doses of naltrexone alone tested, as well as high doses, had no effect on formalin-induced pain (results not shown), while the same doses injected to BTX-A pretreated animals affected differently the BTX-A-induced antinociception (Fig. 2). This result indicates the possible involvement of μ-opioid receptor in antinociceptive effect of BTX-A. Although selective μ-opioid antagonist reversed BTX-A effect similarly as non-selective opioid antagonist (Fig. 1A and C), the involvement of other opioid receptors cannot be completely excluded, since experiments with selective κ- and δ-opioid antagonists were not preformed.

Since previous studies (Bach-Rojecky and Lacković, 2009; Filipovic et al., 2012; Matak et al., 2011) indicated that BTX-A antinociceptive action is of central origin, we hypothesized that the site of BTX-A interaction with opioid receptors in our experiments occurs in the spinal cord. Therefore, to eliminate possible systemic effects of naltrexone, the low, systemically ineffective dose of naltrexone (7 μg/10 μl) was administered intrathecally. Centrally applied naltrexone abolished the antinociceptive activity of peripherally applied BTX-A (Fig. 1B), which confirms the central site of BTX-A action.

To examine whether the association of BTX-A action with opioid receptor is common in different types of pain, we additionally investigated the effect of naltrexone and BTX-A in a model of neuropathic pain induced by partial sciatic nerve transection. Naltrexone (2 mg/kg, s.c.) significantly reduced the antinociceptive effect of BTX-A on mechanical sensitivity to pressure and von Frey filaments, as well as cold allodynia (Fig. 2) in neuropathic animals. This further demonstrates that the mechanism of BTX-A activity in acute inflammatory pain and chronic neuropathic pain, and possibly in other types of pain, is connected with opioid receptor.

Further support for involvement of μ-opioid receptors in antinociceptive effect of BTX-A was demonstrated by examining neuronal activation in spinal cord dorsal horn (Fig. 4). Using c-Fos

expression as a measure of neuronal activation in pain pathways (Coggeshall, 2005) after formalin-induced pain, we showed that BTX-A (5 U/kg i.p.) significantly reduced the number of c-Fos positive neurons in sensory laminae of spinal cord (I–VI) (Fig. 4 A and B). The effect of BTX-A on c-Fos expression in the spinal cord was shown previously in the formalin test (Aoki, 2005), as well as in chronic bladder inflammation model (Vemulakonda et al., 2005). However, in our experiments, effect of BTX-A on nociceptive neuronal activation was prevented by naltrexone (Fig. 4A and B), which parallels the behavioral effect of naltrexone on BTX-A-induced antinociception.

Our results, which suggest the interaction of BTX-A with opioid system, are in accordance with previous studies which examined antinociception of combined application of BTX-A and morphine in low, non-active doses. Auguet et al. (2008) observed significant antinociceptive effect of ineffective dose of morphine (0.03 mg/kg i.p.) applied 3 days after ineffective dose of BTX-A (Dysport) (10 U/kg) in carrageenan-induced inflammatory pain in rats. More recently, significant antinociceptive effect was shown in another study (Vacca et al., 2012) also combining ineffective doses of BTX-A (2 µg/paw) and morphine (1 mg/kg s.c.) in formalin-induced inflammatory pain in mice.

Major finding of present study points to association of BTX-A antinociceptive activity with  $\mu$ -opioid receptors. The nature of this association remains to be elucidated. The possibility that BTX-A has direct agonistic effect on  $\mu$ -opioid receptors seems unlikely, primarily since the analgesic properties and mechanism of actions of BTX-A and opioid agonists are different (the only known mechanism of BTX-A action is the prevention of neuroexocytosis by SNAP-25 cleavage). Most likely explanation for the prevention of BTX-A analgesic effects by opioid antagonists might be that BTX-A, during pain, indirectly increases the antinociceptive activity of endogenous opioid system. This could be achieved either by (1) enhanced synthesis/release of opioid peptides or (2) enhanced opioid receptor function.

(1) Modulation of pain by endogenous opioid peptides as a consequence of their enhanced synthesis/release has been observed in some conditions like stress (Parikh et al., 2011), placebo administration (Eippert et al., 2009; Zubieta et al., 2005), infections (Glattard et al., 2010) and exercise (Goldfarb and Jamurtas, 1997). Possibility that BTX-A enhances spinal opioid peptide synthesis may be supported by studies which reported

that intramuscular injection of BTX-A induces the enkephalin mRNA synthesis in the spinal cord ventral horn (Humm et al., 2000; Jung et al., 1997). These studies examined ventral horn enkephalin mRNA levels, while dorsal horn was not investigated. Effect was visible also in the contralateral side of spinal cord, and at more rostral and caudal spinal cord levels (Humm et al., 2000; Jung et al., 1997).

Recently, Mika et al. (2011) reported that BTX-A lowers the expression of pronociceptin, prodynorphin and proenkephalin mRNA within the dorsal root ganglia, but not in the spinal cord of neuropathic animals. The authors examined the synthesis of endogenous opioids involved in development of neuropathic pain, whose effects can also be mediated by non-neuronal inflammatory cells. Down-regulation of opioid synthesis only at the level of dorsal root ganglia is difficult to associate with present observations, where BTX-A-mediated increase in spinal cord endogenous opioid expression might be expected. There is also a possibility that BTX-A effects in our study are mediated by some other endogenous opioids which were not examined in study of Mika et al. (2011).

Since the only known mechanism of BTX-A action is the prevention of SNARE-mediated neurotransmitter release, to explain how the release of opioids might be enhanced, we speculate that

BTX-A indirectly increases the opioid system activation, via yet unknown mechanism. This indirect action may involve several neurons or neurotransmitters. Additionally, participation of non-neuronal cells, such as glia, cannot be excluded (Mika et al., 2011; Vacca et al., 2012).

If, hypothetically, the antinociceptive effect of BTX-A is associated with increased release of opioid polypeptides, it might be expected that the effect of BTX-A and opioid analgesics, such as morphine, are similar. However, preclinical data suggested that the actions of BTX-A and morphine are quite different. While morphine reduces both phases of the formalin test (Hunnskaar and Hole, 1987), BTX-A acts only in the second, inflammatory phase (Cui et al., 2004; Fig. 1). Additionally, BTX-A, does not increase normal nociceptive thresholds (Bach-Rojecky et al., 2005; Cui et al., 2004) unlike morphine. Reasons for this are not clear, but may be associated with selectivity of the BTX-A effect, in contrast to morphine, for more limited subsets of neurons or synapses targeted by BTX-A.

(2) Another theoretical option is that BTX-A enhances the expression or function of  $\mu$ -opioid receptors. At present there is no direct evidence for that option, but it might be supported by the recent observation that BTX-A antagonizes the morphine-induced tolerance. Morphine-induced tolerance is suggested to be associated with decreased  $\mu$ -opioid receptor functional binding sites (Vacca et al., 2012).

Reversal of antinociceptive activity of BTX-A by shortly acting opioid antagonists is difficult to reconcile with the known mechanism of BTX-A long term action on SNARE complexes and neurotransmitter release. Cleaved SNAP-25 in our experiment is already present in CNS 5 days following the peripheral administration, prior to antagonist administration. However, the possibility that naltrexone, by unknown mechanism, permanently interferes with BTX-A effect on SNAP-25 could not be ruled out. Therefore, we examined if the effect of naltrexone is short-lasting. In contrast to its effect 40 min prior to formalin test, naltrexone administered 24 h prior to nociceptive testing did not influence BTX-A-induced antinociception. This experiment demonstrated that the effect of naltrexone is short-lasting (in line with its pharmacokinetic properties), and that it does not directly prevent the BTX-A activity by reversal of SNAP-25 cleavage.

In summary, SNAP-25 cleavage in CNS is probably only the first step in the overall mechanism of BTX-A action, which leads to activation of endogenous opioid system.

## 5. Conclusion

Present results demonstrate for the first time that the BTX-A activity in acute inflammatory pain and chronic neuropathic pain, and possibly in other types of pain, is associated with  $\mu$ -opioid receptor.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## Acknowledgments

We thank Božica Hržan for excellent technical assistance and students Ana Babić and Ivana Stracenski for help in performing several experiments. This work was supported by Croatian Ministry of Science, Education and Sport (Project No. 108-1080003-0001 to Z. Lacković) and Deutscher Akademischer Austausch Dienst (DAAD, to J. Deckert and Z. Lacković).



## References

- Antonucci, F., Rossi, C., Gianfranceschi, L., Rossetto, O., Caleo, M., 2008. Long-distance retrograde effects of botulinum neurotoxin A. *J. Neurosci.* 28, 3689–3696.
- Aoki, K.R., 2005. Review of a proposed mechanism for the antinociceptive action of botulinum toxin type A. *Neurotoxicology* 26, 785–793.
- Auguet, M., Favre-Guilmond, C., Chabrier, P.E., 2008. Analgesic effects of botulinum toxin A in an inflammatory pain model in rats: comparison of Dysport and Botox; synergistic interaction with morphine. *Abstract. Toxicol.* 51, 1–54.
- Bach-Rojecky, L., Lacković, Z., 2005. Antinociceptive effect of botulinum toxin type A in rat model of carrageenan and capsaicin induced pain. *Croat. Med. J.* 46, 201–208.
- Bach-Rojecky, L., Relja, M., Lacković, Z., 2005. Botulinum toxin type A in experimental neuropathic pain. *J. Neural Transm.* 112, 215–219.
- Bach-Rojecky, L., Lacković, Z., 2009. Central origin of the antinociceptive action of the botulinum toxin type A. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 94, 234–238.
- Bach-Rojecky, L., Šalković-Petrišić, M., Lacković, Z., 2010. Botulinum toxin type A reduces pain supersensitivity in experimental diabetic neuropathy: bilateral effects after unilateral injection. *Eur. J. Pharmacol.* 633, 10–14.
- Blasi, J., Chapman, E.R., Link, E., Binz, T., Yamasaki, S., De Camilli, P., Sudhof, T.C., Niemann, H., Jahn, R., 1993. Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature* 365 (6442), 160–163.
- Coggeshall, R.E., 2005. Fos, nociception and the dorsal horn. *Prog. Neurobiol.* 77, 299–352.
- Correa, J.D., Paiva-Lima, P., Rezende, R.M., Dos Reis, W.G., Ferreira-Alves, D.L., Bakhle, Y.S., Francischi, J.N., 2010. Peripheral mu-, kappa- and delta-opioid receptors mediate the hypoalgesic effect of celecoxib in a rat model of thermal hyperalgesia. *Life Sci.* 86 (25–26), 951–956.
- Cui, M., Khanijou, S., Rubino, J., Aoki, K.R., 2004. Subcutaneous administration of botulinum toxin A reduces formalin-induced pain. *Pain* 107, 125–133.
- De Freitas, R.L., Kubler, J.M., Elias-Filho, D.H., Coimbra, N.C., 2011. Antinociception induced by acute oral administration of sweet substance in young and adult rodents: the role of endogenous opioid peptides chemical mediators and  $\mu$ 1-opioid receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 101, 265–270.
- Dodick, D.V., Turkel, C.C., DeGryse, R.E., Aurora, S.K., Silberstein, S.D., Lipton, R.B., Deiner, H.C., Brin, M.F., PREEMPT Chronic Migraine Study Group, 2010. Onabotulinumtoxin A for treatment of chronic migraine: pooled results from the double-blind, randomized, placebo-controlled phases of the PREEMT Clinical Program. *Headache* 50, 921–936.
- Eippert, F., Bingel, U., Schoell, E.D., Yacubian, J., Klinger, R., Lorenz, J., Büchel, C., 2009. Activation of the opioidergic descending pain control system underlies placebo analgesia. *Neuron* 63 (4), 533–543.
- Favre-Guilmond, C., Auguet, M., Chabrier, P.E., 2009. Different antinociceptive effects of botulinum toxin type A in inflammatory and peripheral polyneuropathic rat models. *Eur. J. Pharmacol.* 617, 48–53.
- Filipovic, B., Matak, I., Bach-Rojecky, L., Lacković, Z., 2012. Central action of peripherally applied botulinum toxin type A on pain and dural extravasation in rat model of trigeminal neuropathy. *PLoS ONE* 7 (1), e29803. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0029803>.
- Glattard, E., Welters, I.D., Lavaux, T., Muller, A.H., Laux, A., Zhang, D., Schmidt, A.R., Delalande, F., Laventie, B.J., Dirrig-Grosch, S., Colin, D.A., Van Dorsselaer, A., Aunis, D., Metz-Boutigue, M.H., Schneider, F., Goumonet, Y., 2010. Endogenous morphine levels are increased in sepsis: a partial implication of neutrophils. *PLoS One* 5 (1), e8791.
- Goldfarb, A.H., Jamurtas, A.Z., 1997. Beta-endorphin response to exercise. An update. *Sports Med.* 24 (1), 8–16.
- Holden, J.E., Jeong, Y., Forrest, J.M., 2005. The endogenous opioid system and clinical pain management. *AACN Clin. Issues* 16 (3), 291–301.
- Humm, A.M., Pabst, C., Lauterburg, T., Burgunder, J.M., 2000. Enkephalin and aFGF are differentially regulated in rat spinal motoneurons after chemodenervation with botulinum toxin. *Exp. Neurol.* 161 (1), 361–372.
- Hunnskaar, S., Hole, K., 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30 (1), 103–114.
- Jabbari, B., Machado, D., 2011. Treatment of refractory pain with botulinum toxins – an evidence-based review. *Pain Med.* 12 (11), 1594–1606.
- Jung, H.H., Lauterburg, T., Burgunder, J.M., 1997. Expression of neurotransmitter genes in rat spinal motoneurons after chemodenervation with botulinum toxin. *Neuroscience* 78 (2), 469–479.
- Lim, E.C.H., Seet, R.C.S., 2010. Use of botulinum toxin in the neurology clinic. *Nat. Rev. Neurol.* 6, 624–636.
- Lindenlaub, T., Sommer, C., 2000. Partial sciatic nerve transection as a model of neuropathic pain: a qualitative and quantitative neuropathological study. *Pain* 89, 97–106.
- Matak, I., Bach-Rojecky, L., Filipović, B., Lacković, Z., 2011. Behavioral and immunohistochemical evidence for central antinociceptive activity of botulinum toxin A. *Neuroscience* 186, 201–207.
- Matak, I., Riederer, P., Lacković, Z., 2012. Botulinum toxin's axonal transport from periphery to the spinal cord. *Neurochem. Int.* 61 (2), 236–239.
- Mika, J., Rojewska, E., Makuch, W., Korostynski, M., Luvisetto, S., Marinelli, S., Pavone, F., Przewlocka, B., 2011. The effect of botulinum neurotoxin A on sciatic nerve injury-induced neuroimmunological changes in rat dorsal root ganglia and spinal cord. *Neuroscience* 175, 358–366.
- Parikh, D., Hamid, A., Friedman, T.C., Nguyen, K., Tseng, A., Marquez, P., Lutfy, K., 2011. Stress-induced analgesia and endogenous opioid peptides: the importance of stress duration. *Eur. J. Pharmacol.* 650 (2–3), 563–567.
- Park, H.J., Lee, Y., Lee, J., Park, C., Moon, D.E., 2006. The effects of botulinum toxin A on mechanical and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Can. J. Anaesth.* 53 (5), 470–477.
- Pavone, F., Luvisetto, S., 2010. Botulinum neurotoxin for pain management: insights from animal models. *Toxins* 2 (12), 2890–2913.
- Restani, L., Antonucci, F., Gianfranceschi, L., Rossi, C., Rossetto, O., Caleo, M., 2011. Evidence for anterograde transport and transcytosis of botulinum neurotoxin A (BoNT/A). *J. Neurosci.* 31 (44), 15650–15659.
- Randall, L.O., Selitto, J.J., 1957. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 61, 409–419.
- Singh, J.A., 2010. Botulinum toxin therapy for osteoarthicular pain: an evidence-based review. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* 2 (2), 105–118.
- Tjølsen, A., Berge, O.G., Hunnskaar, S., Rosland, J.H., Hole, K., 1992. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51 (1), 5–17.
- Vacca, V., Marinelli, S., Eleuteri, C., Luvisetto, S., Pavone, F., 2012. Botulinum neurotoxin A enhances the analgesic effects on inflammatory pain and antagonizes tolerance induced by morphine in mice. *Brain Behav. Immun.* 26, 489–499.
- Vemulakonda, V.M., Somogyi, G.T., Kiss, S., Salas, N.A., Boone, T.B., Smith, C.P., 2005. Inhibitory effect of intravesically applied botulinum toxin A in chronic bladder inflammation. *J. Urol.* 173 (2), 621–624.
- Verebey, K., Volavka, J., Mulé, S.J., Resnick, R.B., 1976. Naltrexone: disposition, metabolism, and effects after acute and chronic dosing. *Clin. Pharmacol. Ther.* 20 (3), 315–328.
- Wei, H., Panula, P., Pertovaara, A., 1998. A differential modulation of allodynia, hyperalgesia and nociception by neuropeptide FF in the periaqueductal gray of neuropathic rats: interactions with morphine and naloxone. *Neuroscience* 86 (1), 311–319.
- Zimmerman, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109–110.
- Zubieta, J.K., Bueller, J.A., Jackson, L.R., Scott, D.J., Xu, Y., Koeppe, R.A., Nichols, T.E., Stohler, C.S., 2005. Placebo effects mediated by endogenous opioid activity on mu-opioid receptors. *J. Neurosci.* 25 (34), 7754–7762.

## PRILOG II

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

## Association of antinociceptive action of botulinum toxin type A with GABA-A receptor

V. Drinovac · L. Bach-Rojecky · Z. Lacković

Received: 15 October 2013 / Accepted: 20 December 2013  
© Springer-Verlag Wien 2014

**Abstract** The mechanism of botulinum toxin type A (BTX-A) antinociceptive action in the central nervous system is little known. The potential interaction between BTX-A and GABAergic system has not been investigated previously. In the present study, we demonstrate prevention of BTX-A antinociceptive effect on formalin-induced inflammatory pain and partial sciatic nerve transection-induced mechanical allodynia by GABA-A antagonist bicuculline, thus suggesting association of the GABA-A receptors and antinociceptive action of BTX-A.

**Keywords** Botulinum toxin type A · Neuropathic pain · Formalin-induced pain · GABA · c-Fos

### Introduction

Botulinum toxin type A (BTX-A) is an endopeptidase which cleaves SNAP-25 (synaptosomal associated protein of 25 kDa) and, consequently, prevents acetylcholine and other neurotransmitter release (Aoki 2008). More recently antinociceptive activity of BTX-A was found in preclinical

(reviewed by Pavone and Luvisetto 2010) and clinical research (reviewed by Jabbari and Machado 2011). During the last decades behavioral (Bach-Rojecky and Lacković 2009; Bach-Rojecky et al. 2010; Favre-Guilhard et al. 2009; Filipovic et al. 2012) and immunobiochemical data revealed that BTX-A antinociceptive action takes place primarily in the central nervous system (CNS) after its retrograde axonal transport from periphery (Antonucci et al. 2008; Matak et al. 2011, 2012). However, the mechanism of central antinociceptive action is not clear. It could be associated with  $\mu$ -opioid receptor (Drinovac et al. 2013), while SNAP-25 cleavage might be only the first step in the overall mechanism of BTX-A antinociceptive action. Sensory information transmitted to the dorsal horn is under strong inhibitory control by gamma-aminobutyric acid (GABA), released by local interneurons and inhibitory descending fibers (Antal et al. 1996; Bardoni et al. 2013). Using bicuculline, a GABA-A receptor antagonist, here we report that the antinociceptive action of BTX-A is associated with GABA-A receptor activity at the spinal level.

### Materials and methods

#### Animals


Male Wistar rats (University of Zagreb School of Medicine), 3 months old and weighing 300–400 g, were kept under standard conditions with free access to food and water. Experiments were conducted according to the European Communities Council Directive (86/609/EEC) and recommendations of the International Association for the Study of Pain. All efforts were made to reduce the number of animals used and to reduce their suffering. Experiments were approved by the ethical committee of the

V. Drinovac · L. Bach-Rojecky  
Department of Pharmacology, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia  
e-mail: vdrinovac@pharma.hr

L. Bach-Rojecky  
e-mail: lbach@pharma.hr

Z. Lacković (✉)  
Laboratory of Molecular Neuropharmacology, Department of Pharmacology and Croatian Brain Research Institute, University of Zagreb School of Medicine, Šalata 11, 10000 Zagreb, Croatia  
e-mail: zdravko.lackovic@mef.hr; lac@mef.hr

Published online: 14 January 2014

 Springer



University of Zagreb, School of Medicine (permit No. 07-76/2005-43).

#### Drug administration

Animals were injected subcutaneously into the plantar surface of the hind paw (intraplantarily, i.pl.) with BTX-A (Botox<sup>®</sup>, Allergan, Inc., Irvine, USA) diluted in 0.9 % saline. BTX-A was injected in a dose of 5 or 7 U/kg and in a volume of 20  $\mu$ l.

Bicuculline hydrochloride (Sigma, St. Louis, MO, USA) was injected: (1) intraperitoneally (i.p., 2 mg/kg, in a volume of 1 ml); (2) intrathecally (i.t., 1  $\mu$ g/10  $\mu$ l) at the lumbar L3–L4 level; and (3) intracisternally (i.c., 1  $\mu$ g/10  $\mu$ l). Bicuculline was dissolved in 0.9 % saline by addition of one drop of 0.01 % HCl. Doses of bicuculline were chosen according to the literature (Micov et al. 2010; Yamamoto and Yaksh 1993).

For i.p. injections, rats were conscious and gently restrained. For bicuculline i.t. and i.c. application, animals were briefly anesthetized with shortly acting diethyl ether (Sigma, St. Louis, MO, USA). For i.t. injection, animal's hair was shaved at the lumbar L3–L4 level. After skin incision bicuculline or saline were injected between the vertebrae using a Hamilton syringe. During i.c. application, animals were placed in a position in which the posterior neck area was easy to reach. The needle of the Hamilton syringe was carefully advanced between the occipital protuberance and the spine of the atlas to the cisterna magna (Ueda et al. 1979).

#### Behavioral testing

##### *Formalin-induced pain*

Conscious, gently restrained rats were s.c. injected with 5 % formalin (50  $\mu$ l) into the plantar surface of the hind paw pad and immediately returned to the transparent cage for 1-h observation period. The number of licking, flinching and shaking of the injected paw was measured (Tjolsen et al. 1992). Each experimental group contained 5–6 animals.

BTX-A was injected 5 days and bicuculline 40 min prior to induction of pain, respectively. Control animals received 0.9 % saline in the appropriate volumes and underwent the same procedure as animals treated with bicuculline.

##### *Sciatic nerve transection-induced mechanical allodynia*

A total number of 45 rats underwent sciatic nerve partial transection, as previously described (Lindenlaub and Sommer 2000; Drinovac et al. 2013). Five rats were

subjected to sham procedure; sciatic nerve was exposed, but not transected and five naive rats served as control. Two weeks following the peripheral nerve injury, animals which developed ipsilateral mechanical allodynia (at least 20 % changes from the mean of the sham-operated group) were included into the further experiment. Nociceptive measurements of mechanical allodynia with von Frey filaments were conducted as previously described (Drinovac et al. 2013). Neuropathic animals were divided in four groups (six animals per group) as follows: (1) 0.9 % saline (i.pl.), (2) BTX-A (7 U/kg; i.pl.), (3) bicuculline (2 mg/kg, i.p.), (4) BTX-A + bicuculline. Nociceptive measurements were performed 5 days after BTX-A i.pl. injection and 40 min prior to bicuculline i.p. injection.

During all behavioral measurements the experimenter was unaware of the treatment groups.

#### Immunohistochemistry

Immunohistochemical analysis of c-Fos expression in the rat spinal cord was done as previously described (Drinovac et al. 2013) in samples collected from formalin test experiment.

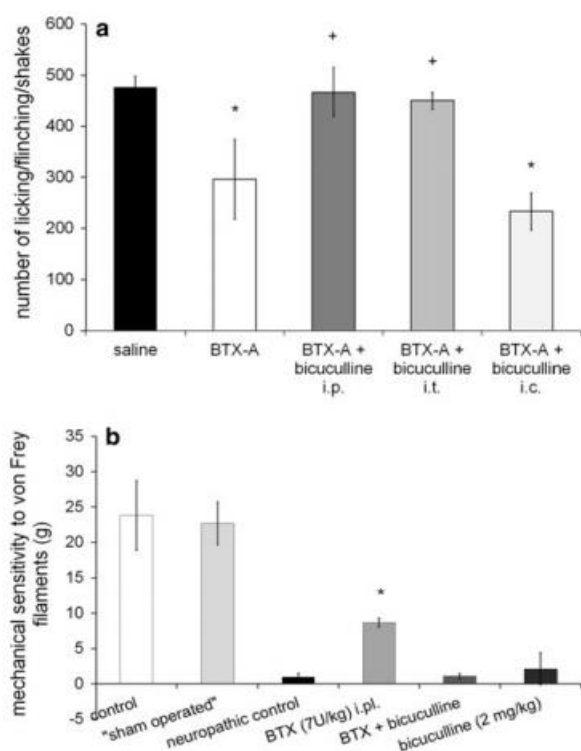
#### Statistical analysis

Results, presented as mean  $\pm$  SD, were analyzed by one-way analysis of variance followed by the Tukey's post hoc test.  $p < 0.05$  was considered significant.

## Results

Systemic bicuculline (2 mg/kg, i.p.) application 40 min prior to the formalin test abolished the antinociceptive action of peripheral BTX-A (5 U/kg) injection in the second phase of the test ( $p < 0.01$ , Fig. 1). To examine the possible central site of bicuculline action on BTX-A-induced antinociception, low-dose bicuculline (1  $\mu$ g/10  $\mu$ l) was injected intrathecally and intracisternally, respectively. Similarly to several hundred times higher systemic dose, intrathecally applied bicuculline abolished the antinociceptive effect of peripherally applied BTX-A ( $p < 0.01$ ; Fig. 1). However, bicuculline injection into the cerebello-medullary cistern did not affect BTX-A-induced antinociceptive effect. The respective doses of bicuculline alone, applied i.p., i.t. or i.c. did not affect pain behavior (data not shown). None of the tested drugs or their combinations affected pain in the first phase of the formalin test (data not shown).

In addition to inflammatory pain, GABA-A receptor antagonist prevented the antiallodynic effect of BTX-A in



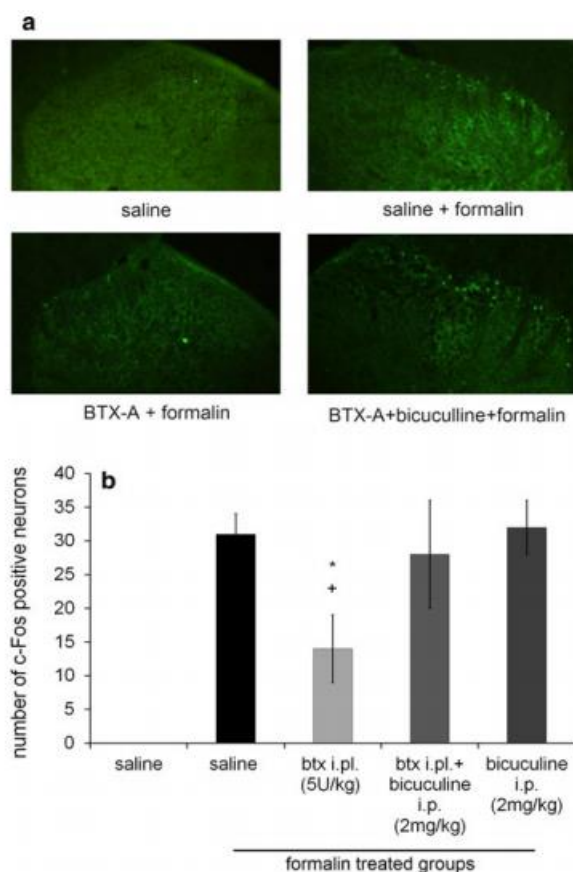
**Fig. 1** Influence of bicuculline on the antinociceptive action of BTX-A in: **a** the second phase of the formalin test [BTX-A 5 U/kg was applied 5 days prior formalin injection into the plantar surface of the rat's hind paw; bicuculline was injected: intraperitoneally (i.p., 2 mg/kg); intrathecally (i.t., 1 µg/10 µl), and intracisternally (i.c., 1 µg/10 µl) 40 min prior nociceptive testing; results are presented as mean ± SD;  $n = 5-6$ ; \* $p < 0.01$  compared to saline (control); <sup>+</sup> $p < 0.01$  compared to BTX-A treated animals, Tukey post hoc]; and **b** partial sciatic nerve transection-induced mechanical allodynia (measurements were conducted 5 days following i.pl. BTX-A 7 U/kg injection and 40 min following i.p. bicuculline 2 mg/kg injection; results presented as mean ± SD;  $n = 5-6$ . \* $p < 0.01$  compared to neuropathic control, bicuculline and BTX-A + bicuculline; Tukey post hoc)

partial sciatic nerve transection-induced mechanical allodynia as well ( $p < 0.01$ , Fig. 1b).

Immunohistochemical data showed reduction of c-Fos positive neurons in BTX-A pretreated animals in comparison to formalin group ( $p < 0.01$ , Fig. 2). Bicuculline (2 mg/kg, i.p.) prevented the effect of BTX-A on c-Fos expression ( $p < 0.05$ , Fig. 2).

## Discussion

Contrary to usual assumption (Aoki and Francis 2011), numerous recent behavioral data suggest that antinociceptive action of BTX-A occurs within CNS. Discovery of



**Fig. 2 a** Expression of immunofluorescently labeled c-Fos (green punctate immunoreactivity) in the ipsilateral (to the site of formalin injection) superficial laminae of the L4 spinal cord sections. Representative examples of  $\times 10$  magnification images. Scale bar 200 µm. **b** Quantitative analysis of c-Fos expression in laminae I and II from  $\times 10$  magnification images. Total number of c-Fos positive neurons in sensory laminae in different formalin-treated experimental groups: saline; BTX-A; BTX-A + bicuculline; bicuculline. Average number of c-Fos positive neurons for each animal was calculated from three spinal cord sections. Mean ± SD,  $n = 4$ ; \* $p < 0.01$  compared to control (saline); <sup>+</sup> $p < 0.05$  compared to BTX-A + bicuculline (Tukey post hoc)

BTX-A axonal transport provides physiological background for these behavioral observations (Antonucci et al. 2008; Restani et al. 2011). Moreover, truncated SNAP-25 was found in the CNS sensory nuclei after toxin's peripheral application (Matak et al. 2011, 2012). Recently, we demonstrated prevention of BTX-A effects on pain and c-Fos expression by opioid antagonists thus suggesting the association between antinociceptive action of BTX-A and central  $\mu$ -opioid receptor (Drinovac et al. 2013). However, based on complex neurotransmitter network involved in central modulation of nociception, it seems unlikely that opioid system is the only one affected by the BTX-A.



The superficial laminae of the spinal cord dorsal horn are under strong inhibitory control, primarily by inhibitory transmitter GABA, released by both local interneurons and inhibitory descending fibers. Acting through ionotropic GABA-A and metabotropic GABA-B receptors, GABA controls the flow of sensory information by regulating the excitability of dorsal horn neurons and by modulation of transmitter release from primary afferent terminals (Bardoni et al. 2013; Melin et al. 2013). It is assumed that damaged dorsal horn inhibition contributes to persistent pain hypersensitivity (Moore et al. 2002).

We hypothesized that the site of BTX-A interaction with GABA-A receptors occurs in the spinal cord, although we could not exclude a supraspinal structures. Therefore, bicuculline was applied in three ways: intraperitoneally, intrathecally—in the spinal canal, and into the cisterna magna. When injected intrathecally in a dose as low as 1 µg, as well as after intraperitoneal application in several hundred times higher dose (0.6–0.8 mg), bicuculline abolished the antinociceptive activity of peripherally applied BTX-A, which confirms the central site of BTX-A action. In support to that, bicuculline (2 mg/kg, i.p.) prevented the effect of BTX-A on c-Fos expression ( $p < 0.05$ , Fig. 2). However, bicuculline application into the cisterna magna did not affect the antinociceptive action of BTX-A, excluding supraspinal level as a possible site of interaction between GABA and BTX-A action. In addition, prevention of antinociceptive effect of BTX-A was demonstrated in another type of pain, as well. Mechanical allodynia is common feature of neuropathic pain. I.pl. injection of BTX-A reduced mechanical sensitivity to von Frey filaments ( $p < 0.01$ , Fig. 1b) in neuropathic animals, but i.p. injection of GABA-A antagonist abolished the antinociceptive effect in BTX-A pretreated animals ( $p < 0.01$ , Fig. 1b).

We speculate that antinociceptive activity of BTX-A is prevented by GABA-A antagonist bicuculline due to reduction of GABAergic synaptic inhibition in the spinal cord, which is believed to be important factor contributing to the generation and maintenance of chronic pain (Bardoni et al. 2013). In our previous work (Drinovac et al. 2013), opioid antagonists prevented the antinociceptive effect of BTX-A. Since the mechanism of BTX-A action is inhibition of neurotransmitter release by cleavage of SNAP-25, we hypothesized that in some neuronal loop BTX-A should decrease inhibitory GABA activity. This could in turn disinhibit/increase the stimulation of  $\mu$ -opioid receptor. However, observed result did not confirm our hypothesis. Apparently the picture is more complex and activation of two spinal inhibitory neurotransmitter systems, GABA and endogenous opioids, is involved. We still assume that existence of some complex neuronal loop could be the best explanation for BTX-A effects on opioid and GABA transmission. Since mature GABAergic nerve terminals

probably lack SNAP-25 (reviewed by Matteoli et al. 2009), the effect of BTX-A cannot be other than indirect. However, how GABA and opioids are stimulated with a drug that blocks neurotransmitters release remains a puzzle for further investigation.

## References

- Antal M, Petkó M, Polgár E, Heizmann CW, Storm-Mathisen J (1996) Direct evidence of an extensive GABAergic innervation of the spinal dorsal horn by fibres descending from the rostral ventromedial medulla. *Neuroscience* 3(2):509–518
- Antonucci F, Rossi C, Gianfranceschi L, Rossetto O, Caleo M (2008) Long-distance retrograde effects of botulinum neurotoxin A. *J Neurosci* 28:3689–3696
- Aoki KR (2008) Future aspects of botulinum neurotoxins. *J Neural Transm* 115:567–573
- Aoki KR, Francis J (2011) Updates on the antinociceptive mechanism hypothesis of botulinum toxin A. *Parkinsonism Relat Disord Suppl* 1:S28–S33
- Bach-Rojecky L, Lacković Z (2009) Central origin of the antinociceptive action of the botulinum toxin type A. *Pharmacol Biochem Behav* 94:234–238
- Bach-Rojecky L, Šalković-Petrišić M, Lacković Z (2010) Botulinum toxin type A reduces pain supersensitivity in experimental diabetic neuropathy: bilateral effects after unilateral injection. *Eur J Pharmacol* 633:10–14
- Bardoni R, Takatawa T, Tong CK, Choudhury P, Scherre G, MacDermott AB (2013) Pre- and postsynaptic inhibitory control in the spinal cord dorsal horn. *Ann NY Acad Sci* 1279:90–96
- Drinovac V, Bach-Rojecky L, Matak I, Lacković Z (2013) Involvement of  $\mu$ -opioid receptors in antinociceptive action of botulinum toxin type A. *Neuropharmacology* 70:331–337
- Favre-Guilmarc C, Auguet M, Chabrier PE (2009) Different antinociceptive effects of botulinum toxin type A in inflammatory and peripheral polyneuropathic rat models. *Eur J Pharmacol* 617:48–53
- Filipovic B, Matak I, Bach-Rojecky L, Lacković Z (2012) Central action of peripherally applied botulinum toxin type A on pain and dural extravasation in rat model of trigeminal neuropathy. *PLoS One* 7(1):e29803. doi:10.1371/journal.pone.0029803
- Jabbari B, Machado D (2011) Treatment of refractory pain with botulinum toxins—an evidence-based review. *Pain Med* 12(11):1594–1606
- Lindenlaub T, Sommer C (2000) Partial sciatic nerve transection as a model of neuropathic pain: a qualitative and quantitative neuropathological study. *Pain* 89:97–106
- Matak I, Bach-Rojecky L, Filipović B, Lacković Z (2011) Behavioral and immunohistochemical evidence for central antinociceptive activity of botulinum toxin A. *Neuroscience* 186:201–207
- Matak I, Riederer P, Lacković Z (2012) Botulinum toxin's axonal transport from periphery to the spinal cord. *Neurochem Int* 61:236–239
- Matteoli M, Pozzi D, Grumelli C, Condliffe SB, Frassoni C, Harkany T, Verderio C (2009) The synaptic split of SNAP-25: different roles in glutamatergic and GABAergic neurons? *Neuroscience* 158(1):223–230
- Melin C, Jacquot F, Dalle R, Artola A (2013) Segmental disinhibition suppresses C-fiber inputs to the rat superficial medullary dorsal horn via activation of GABA-B receptors. *Eur J Neurosci* 37:417–428

- Micov A, Tomić M, Popović B, Stepanović-Petrović R (2010) The antihyperalgesic effect of levetiracetam in an inflammatory model of pain in rats: mechanism of action. *Br J Pharmacol* 161(2):384–392
- Moore KA, Kohno T, Karchewski LA, Scholz J, Baba H, Woolf CJ (2002) Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J Neurosci* 22(15):6724–6731
- Pavone F, Luvisetto S (2010) Botulinum neurotoxin for pain management: insights from animal models. *Toxins* 2(12):2890–2913
- Restani L, Antonucci F, Gianfranceschi L, Rossi C, Rossetto O, Caleo M (2011) Evidence for anterograde transport and transcytosis of botulinum neurotoxin A (BoNT/A). *J Neurosci* 31(44):15650–15659
- Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K (1992) The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51(1):5–17
- Ueda H, Amano H, Shiomi H, Takagi H (1979) Comparison of the analgesic effects of various opioid peptides by a newly devised intracisternal injection technique in conscious mice. *Eur J Pharmacol* 56:265–268
- Yamamoto T, Yaksh TL (1993) Effects of intrathecal strychnine and bicuculline on nerve compression-induced thermal hyperalgesia and selective antagonism by MK-801. *Pain* 54(1):79–84

## **PRILOG III**

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





Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ejphar](http://www.elsevier.com/locate/ejphar)

Neuropharmacology and analgesia

## Antinociceptive effect of botulinum toxin type A on experimental abdominal pain

Višnja Drinovac<sup>a</sup>, Lidija Bach-Rojecky<sup>a</sup>, Ana Babić<sup>a</sup>, Zdravko Lacković<sup>b,\*</sup><sup>a</sup> Department of Pharmacology, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry, 10000 Zagreb, Croatia<sup>b</sup> Laboratory of Molecular Neuropharmacology, Department of Pharmacology and Croatian Brain Research Institute, University of Zagreb Medical School, 10000 Zagreb, Croatia

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 4 June 2014  
 Received in revised form  
 16 October 2014  
 Accepted 22 October 2014  
 Available online 30 October 2014

## Keywords:

Botulinum toxin type A  
 Visceral pain  
 Abdominal pain  
 Capsaicin  
 Acetic acid  
 Rat

## ABSTRACT

Visceral pain, especially in the abdominal region, represents one of the most common types of pain. Its chronic form is usually very hard to treat by conventional analgesic agents and adjuvants. We investigated the antinociceptive effect of botulinum toxin type A (BTX-A) in male Wistar rats in two models of visceral pain: peritonitis induced by intraperitoneal injection of 1% acetic acid and colitis induced by intracolonic instillation of 0.1% capsaicin. Pain was measured as the number of abdominal writhes. Additionally, referred mechanical sensitivity in the ventral abdominal area was evaluated by von Frey test and the extent of spinal c-Fos expression was immunohistochemically examined. BTX-A significantly reduced the number of abdominal writhes in both models of visceral pain after intrathecal application in a dose of 2 U/kg. In the experimental colitis model, BTX-A (2 U/kg) reduced both referred mechanical allodynia and c-Fos expression in the dorsal horn of the spinal cord (S2/S3 segments). In contrast to intrathecal administration, BTX-A (2 U/kg) administered into the cisterna magna had no effect on pain suggesting that the primary site of its action is a spinal cord.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Botulinum toxin type A (BTX-A) inhibits neurotransmitter release due to its endopeptidic activity against SNAP-25 (Synaptosomal Associated Protein of 25 kDa). This enables its therapeutic use in disorders characterized by overactive muscles, overactive exocrine glands and, most recently, non-muscular pain conditions (reviewed by Dressler (2013) and Matak and Lacković (2014)). Antinociceptive activity of BTX-A was demonstrated in various preclinical (reviewed by Pavone and Luvisetto (2010)) and clinical studies (reviewed by Jabbari and Machado (2011)) during the last decade. It was shown that a single injection reduces pain over a prolonged period of time (several months), which represents the unique feature of BTX-A among available analgesics.

Visceral pain, defined as pain arising from the internal organs of the body, is one of the most common forms of pain. In contrast to somatic pain, key features of visceral pain are diffuse

localization typically referred to somatic sites (e.g. muscle and skin), stronger emotional and autonomic reactions, an unreliable association with pathology, and intense referred hyperalgesia (Ness, 1999; Sanoja et al., 2010). Despite of these differences, treatment has been the same as for somatic pain: based on non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), opioids and adjuvant analgesics like tricyclic antidepressants, antiepileptic drugs etc.

Unlike acute forms of visceral pain, chronic visceral pain might be refractory to the listed drugs because of their short duration of action, variable effectiveness, and unwanted side effects (Davis, 2012). Thus, there is a need for new therapeutic options with better effectiveness, longer duration of action and acceptable tolerability.

Up to now, visceral effects of BTX-A were clinically investigated mostly in painful bladder and pelvic syndromes (reviewed by Russell et al. (2013) and Jhang et al. (2014)). In addition, a few case reports pointed toward the beneficial effect of BTX-A in non-cardiac chest pain (Maradey-Romero and Fass, 2014) and perineal pain (Lim et al., 2010). Experimentally, the antinociceptive effect of BTX-A was investigated only in cystitis (Chuang et al., 2004; Coelho et al., 2014) and prostatitis (Chuang et al., 2008). In all listed reports and studies, the antinociceptive effect of primarily local BTX-A injections was examined.

Here we report that intrathecal, but not local and systemic, BTX-A application reduces pain as well as referred hyperalgesia and spinal c-Fos expression in experimental models of acetic acid induced peritonitis and capsaicin induced colitis.

**Abbreviations:** BTX-A, botulinum toxin type A; CNS, central nervous system; CSF, cerebrospinal fluid; GABA,  $\gamma$ -aminobutyric acid; i.c., intracisternal; i.col., intracolonic; i.p., intraperitoneal; i.t., intrathecal; NGS, normal goat serum; NSAIDs, Non-steroidal anti-inflammatory drugs; PBS, phosphate buffered saline; PBST, PBS + 0.25% TritonX-100; RVM, rostral ventromedial medulla; SNAP-25, Synaptosomal Associated Protein of 25 kiloDaltons

\* Corresponding author. Tel./fax: +385 1 4566 843.

E-mail address: lac@mef.hr (Z. Lacković).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.10.038>

0014-2999/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Experiments were carried out on male Wistar rats (300–400 g; University of Zagreb Medical School, Croatia). Animals were housed in a 12 h light/dark cycle with food and water available ad libitum, except during behavioral testing. Experiments were conducted according to the European Communities Council Directive (2010/63/EU). Care and handling of the animals were in accordance with the recommendations of the International Association for the Study of Pain (Zimmermann, 1983). Efforts were made to minimize the number of animals used. Study design, experimental protocols, and descriptions of animal treatment are closely followed by ARRIVE guidelines. Experiments were approved by the Ethical Committee of the University of Zagreb Medical School (Permit no. 07-76/2005-43).

### 2.2. Drugs

The following drugs and chemicals were used: BTX-A (Botox<sup>®</sup>, Allergan, Inc., Irvine, USA); acetic acid (Kemika, Zagreb, Croatia); capsaicin (Sigma, St. Louis, MO, USA); chloral hydrate (Merck KGaA, Darmstadt, Germany); ethanol (Kemika, Zagreb, Croatia); Tween 80 (Sigma, St. Louis, MO, USA) and petroleum jelly (Kemika, Zagreb, Croatia).

Each vial of Botox<sup>®</sup> contains 100 U (~4.8 ng) of purified *Clostridium botulinum* type A neurotoxin complex. To attain the needed doses, all drugs were diluted or dissolved in 0.9% saline, except capsaicin, which was dissolved in 0.9% saline containing 10% Tween and 10% ethanol.

Doses selected to test antinociceptive effect were chosen based on preliminary experiments and published data in models of somatic pain (Cui et al., 2004; Bach-Rojecky et al., 2010).

The following chemicals were used for the immunohistochemistry: paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), normal goat serum (Vector, Inc., Burlingame, CA, USA), c-Fos rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA), goat anti-rabbit Alexa Fluor-448 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), anti-fading agent (Fluorogel, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA).

### 2.3. Drug administration

#### 2.3.1. Intrathecal (i.t.) injection

A small skin incision (2 cm) was performed at the lumbar L4/L5 level. BTX-A (2 U/kg) or 0.9% saline was injected between the vertebrae in a volume of 20  $\mu$ l and the skin was sutured; correctness of application was verified by the animal's tail or hind limb brisk move.

#### 2.3.2. Intracisternal (i.c.) injection

The animals were placed in a position in which the posterior neck area was easy to reach. The needle was carefully advanced between the occipital protuberance and the spine of the atlas to the cisterna magna, and BTX-A (2 U/kg) or 0.9% saline was injected in a volume of 20  $\mu$ l; correctness of application was verified by extraction of a small amount of cerebrospinal fluid (CSF).

#### 2.3.3. Intracolonic (i.col.) instillation

BTX-A (10 U/kg) or 0.9% saline in a volume of 1 mL were guided 7 cm proximally from the anocutaneous line, via the anus with a transparent 1 mm diameter cannula.

The animals were anesthetized with i.p. injection of chloral hydrate (300 mg/kg) during the i.t., i.c. and i.col. administration.

#### 2.3.4. Intraperitoneal (i.p.) injection

BTX-A (15 U/kg) or 0.9% saline were injected in a volume of 10 mL/kg to conscious, gently restrained animals.

### 2.4. Behavioral testing

Before testing, the animals were habituated to the testing area (plastic cage/plastic cage with a wire mesh floor) for 30 min. Each experimental group contained 5–6 animals.

#### 2.4.1. Acetic acid induced visceral pain model ("The writhing test")

The animals were i.p. injected with 10 mL/kg of 1% acetic acid and immediately returned to the transparent cage for a 1 h observation period, as described by Koster et al. (1959). Pain was measured as the number of abdominal writhes. A writhe is defined as arching of the back, extension of hind limbs and contraction of abdominal musculature. Measurements were conducted 5 days after i.c. and i.p. BTX-A or 0.9% saline injection and 2 days after the i.t. injections.

#### 2.4.2. Capsaicin induced visceral pain model

The model was originally developed for mice (Laird et al., 2001), and later adapted for use in rats (Sanoja et al., 2010). In brief, 200  $\mu$ l of 0.1% capsaicin was administered into the colon, 7 cm proximally from the anocutaneous line, via the anus, with a transparent 1 mm diameter cannula. Before i.col. capsaicin instillation, petroleum jelly (Vaseline) was applied on the perianal area to avoid direct contact with the irritant. Control animals were subjected to the same treatment, but instead of capsaicin, received 0.9% saline. Animals injected with i.t. BTX-A or 0.9% saline were tested after 2 days, while those i.col. instilled, after 5 days.

Immediately after i.col. instillation of 0.1% capsaicin or 0.9% saline, the animals were returned to the transparent cage for a 20 min observation period where spontaneous behavior was observed and counted. Visceral pain behavior was considered licking and contraction of the abdomen, stretching, hump-backed position and hunching (Sanoja et al., 2010). After 20 min, referred mechanical hyperalgesia was tested by using a series of von Frey filaments (Stoelting Co, Wood Dale, IL, USA) ranging from 1 g to 26 g, in ascending order, to the abdominal area with the exception of genital area. Repeated stimulation of the same area was avoided to prevent sensitization. The lowest filament that elicited a withdrawal response was considered the threshold stimulus. Each filament was applied 3 times, kept in bent position for 2 s and with an inter-stimulus interval of 5–10 s.

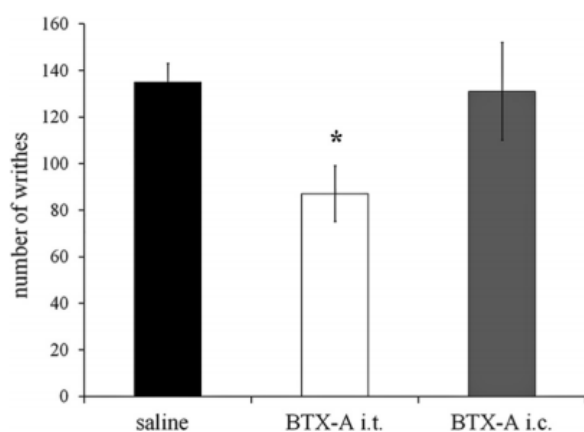
### 2.5. Immunohistochemical analysis

An immunohistochemical analysis was performed as previously described (Drinovac et al., 2013) on samples collected from the capsaicin induced visceral pain model. The number of c-Fos was counted in the superficial sensory laminae of the spinal cord dorsal horn (I and II) at the sacral S3/S2 section.

### 2.6. Statistical analysis

Results, presented as mean  $\pm$  S.D., were analyzed by one-way analysis of variance followed by Tukey's post-hoc test.  $P < 0.05$  was considered significant.





**Fig. 1.** I.t. BTX-A (2 U/kg) injection reduces pain behavior induced by 1% acetic acid i.p. injection. Mean  $\pm$  S.D.;  $n=6$ ;  $P < 0.05$  compared to saline (ANOVA followed by Tukey's post-hoc).

### 3. Results

#### 3.1. Intrathecal BTX-A reduces pain induced by intraperitoneal acetic acid injection

I.p. acetic acid induced abdominal writhes, a stereotypic response pattern in a form of abdominal contractions, twisting and turning of the trunk, and extension of the hind limbs (Koster et al., 1959). BTX-A injected i.t. reduced the number of abdominal writhes ( $P < 0.05$ ). However, BTX-A application into the cisterna magna failed to affect pain induced by acetic acid injection (Fig. 1).

A large volume (10 mL/kg) and dose (15 U/kg) of BTX-A administered into the peritoneal area had no significant antinociceptive effect on experimental peritonitis (results not shown). BTX-A applied in this dose caused significant muscle weakness which may have affected the results.

#### 3.2. Intrathecal BTX-A reduces spontaneous pain and referred hyperalgesia induced by intracolonic capsaicin injection

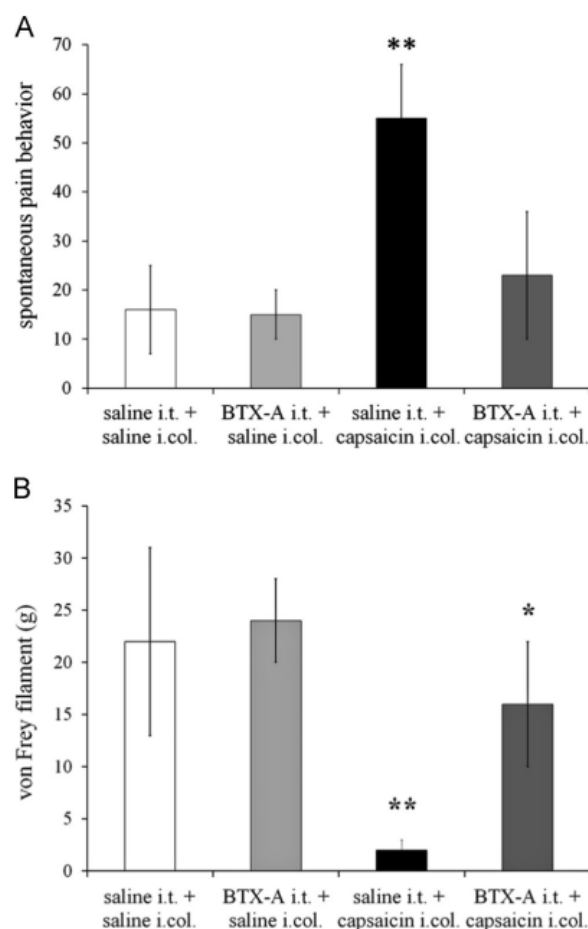
I.col. instillation of capsaicin evoked a significant increase in visceral spontaneous pain-related behavior during a 20 min observation period compared to i.col. instillation of saline. Abdominal contractions induced by saline instillation were related to the injected volume and colonic distention. BTX-A pretreatment did not reduce abdominal contractions induced by saline instillation per se (Fig. 2A). However, i.t. BTX-A pretreatment alleviated spontaneous pain behavior caused by capsaicin instillation ( $P < 0.01$ ).

I.col. capsaicin, but not saline, produced referred secondary mechanical hyperalgesia to the abdomen (Fig. 2B). I.t. BTX-A pretreatment reduced the pain referred to the abdominal area ( $P < 0.01$ ).

Local, i.col., administration of BTX-A (10 U/kg) did not affect spontaneous pain nor referred hyperalgesia in the colitis model as well (results not shown).

#### 3.3. Intrathecal BTX-A reduces c-Fos immunoreactivity in capsaicin induced visceral pain

c-Fos immunoreactivity was investigated in the lumbosacral segment (L6-S2) of the spinal cord of rats with capsaicin-induced colitis (Fig. 3). I.t. BTX-A significantly reduced the number of c-Fos positive cells in the sacral S2/S3 region ( $P < 0.05$ ). The majority of capsaicin-evoked c-Fos-positive neurons were located in the superficial dorsal horns (Fig. 3B).

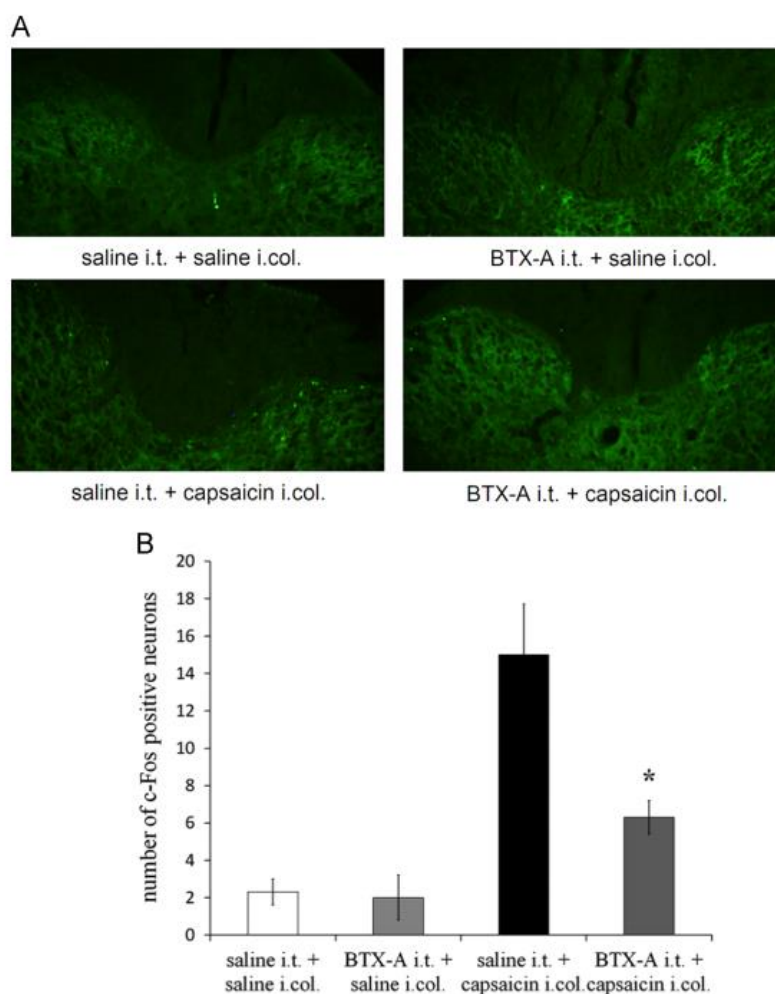


**Fig. 2.** I.t. BTX-A (2 U/kg) pretreatment reduces: A) spontaneous pain behavior induced by capsaicin (0.1%) i.col. instillation. Mean  $\pm$  S.D.,  $n=6$ ; \*\* $P < 0.01$  compared to saline i.t.+saline i.col., BTX-A i.t.+saline i.col. and BTX-A i.t.+capsaicin i.col.; B) referred mechanical hyperalgesia 20 min after i.col. capsaicin instillation. Mean  $\pm$  S.D.,  $n=6$ ; \* $P < 0.05$  compared to saline i.t.+saline i.col. and BTX-A i.t.+saline i.col.; \*\* $P < 0.01$  compared to saline i.t.+saline i.col., BTX-A i.t.+saline i.col. and BTX-A i.t.+capsaicin i.col. (ANOVA followed by Tukey's post-hoc).

### 4. Discussion

In contrast to different types of somatic pain (reviewed by Pavone and Luvisetto (2010) and Matak and Lacković (2014)) the information related to the beneficial action of BTX-A on pain arising from the viscera is mostly limited to the pelvic region. It was found that local BTX-A injections efficiently decrease pain in patients suffering from bladder pain syndrome/interstitial cystitis, prostatitis and pelvic-floor muscle disorder (Abbott et al., 2006; Chung et al., 2012; El-Khawand et al., 2013; Gottsch et al., 2011; Kuo, 2013; Pinto et al., 2013; Smith et al., 2004; Zermann et al., 2000). In addition, there are isolated case reports on the beneficial effect of BTX-A on non-cardiac chest pain (Maradey-Romero and Fass, 2014) and perineal pain (Lim et al., 2010).

Since preclinical investigations on visceral pain are sparse, limited just to rat models of cystitis and prostatitis (Chuang et al., 2004, 2008, 2009), the aim of the present study was to investigate the effect of BTX-A after its central (i.t. and i.c.) application on two pathophysiologically different types of visceral pain. Central application was used because it was shown in behavioral studies (Bach-Rojecky and Lacković, 2005, 2009; Bach-Rojecky et al., 2010; Favre-Guilmond et al., 2009; Filipović et al., 2012), and by immunohistochemistry, that



**Fig. 3.** A) Expression of immunofluorescently labeled c-Fos (green punctate immunoreactivity) in the superficial laminae of the S2/S3 spinal cord sections. Representative examples of  $10\times$  magnification images. Scale bar:  $200\ \mu\text{m}$ . B) Quantitative analysis of c-Fos expression in laminae I and II from  $10\times$  magnification images. Total number of c-Fos positive neurons in superficial sensory laminae of spinal cord dorsal horn. The average number of c-Fos positive neurons for each animal was calculated from three spinal cord sections. Mean  $\pm$  S.D.,  $n=4$ ; \* $P < 0.01$  compared to saline i.t. + capsaicin i.col. (ANOVA followed by Tukey's post-hoc).

the antinociceptive action of BTX-A is associated with its axonal transport from the periphery to central sensory centers (Matak et al., 2011, 2012), in contrast to classical assumption that BTX-A inhibits neurotransmitter release only peripherally (Aoki, 2005). Although the mechanism of central BTX-A's action is unknown, we recently demonstrated an interaction with spinal endogenous opioid peptides and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) (Drinovac et al., 2013, 2014).

Accordingly, in our experiments BTX-A was injected peripherally (i.p., i.col.) or centrally (i.t., i.c.) to investigate the effect of BTX-A injections on spontaneous pain, referred hyperalgesia and neuronal activation induced by i.col. capsaicin instillation, as well as i.p. acetic acid induced pain behaviors.

These two models of visceral pain mutually differ:

1. Capsaicin induced colonic pain represents visceral pain, associated with the activation of visceral nociceptors (Sanoja et al., 2010), while acetic acid induced peritoneal pain is considered to be mixed somato-visceral pain, i.e. the somatic component cannot be excluded due to possible sensitization of somatic peritoneal nociceptors by acetic acid (Ness, 1999).

2. In addition to the splanchnic and pelvic nerve, visceromotor response to i.p. acetic acid is mediated by the vagus nerve as well (De Groat, 1986; Sengupta, 2009).
3. I.col. capsaicin instillation produces referred hyperalgesia, a characteristic feature of visceral pain, due to the convergence of somatic afferents on viscerosensitive spinal neurons (Cervero, 2000; Traub, 2003). This is not observed in acetic acid induced peritonitis.

In the present study we showed that i.t. BTX-A injection significantly reduced acetic-acid induced pain behaviors (Fig. 1). To investigate whether the effect of BTX-A is restricted to the spinal cord, we applied the toxin into the cisterna magna, in the same volume and dose as into the spinal canal. After i.c. application, BTX-A failed to affect pain induced by acetic acid, thus indicating that BTX-A's antinociceptive action is predominantly of spinal origin. Since studies on different models of somatic pain demonstrated the antinociceptive effect of BTX-A after peripheral, subcutaneous application (reviewed by Pavone and Luvisetto (2010) and Matak and Lacković (2014)), here we investigated the



effect of i.p. applied BTX-A. Injection of BTX-A in peritoneal area also had no antinociceptive effect, but rather caused visible abdominal muscle weakness which made evaluation of nociceptive behavior unreliable.

I.t. BTX-A injection in a dose as low as 2 U/kg decreases spontaneous pain as well as referred hyperalgesia induced by i.col. capsaicin instillation (Fig. 2). Reduction of secondary referred hyperalgesia cannot be explained without the assumption that BTX-A interferes with central sensitization at the spinal level. Local application of BTX-A (10 U/kg) into the lumen of the colon had no significant antinociceptive effect, even though the applied dose was five times higher than the i.t. dose (2 U/kg) (results not shown). The reasons might be a short retention of BTX-A in the colon, insufficient absorption of BTX-A, as well as an inability of BTX-A to enter the nerves from the lumen of the colon. The latter seems likely since it was demonstrated that after instillation into the lumen of the bladder in guinea pigs, BTX-A does not enter the nerve fibers (Coelho et al., 2012).

Visceral primary afferents, contrary to somatic primary afferents, enter the spinal cord and spread largely to enter multiple spinal segments above and below the segment of entry. Additionally, they form synaptic contacts with both superficial and deep

dorsal horn neurons ipsilateral and contralateral to the side of entry (Sugiura and Tonosaki, 1995). The result is extensive, diffuse, central nervous system activation which counteracts the somatotopic organization that provides the precise localization of somatic stimuli. Capsaicin instillation into the colon induced neuronal activity in the lumbosacral spinal cord which appears to mediate reflex responses to acute and inflammatory colonic pain (Pitcher et al., 2013). Here, we showed that i.t. BTX-A significantly reduced c-Fos expression in the sacral S2/S3 segments of the spinal cord (Fig. 3).

An important finding of this study is the reduction of referred mechanical sensitivity by i.t. BTX-A in experimental colitis (Fig. 2B). The mechanism of transfer of visceral hypersensitivity to somatic structures is poorly understood and investigated. It is considered to be centrally mediated by mechanisms of central sensitization, similar to somatic pain (Gebhart and Bielefeldt, 2008). Recent experimental findings suggest that the development of somatic and visceral hyperalgesia and allodynia is paralleled by an increase in the responsiveness of RVM On-like cells (Rostral Ventromedial Medulla On-like cells) (Sanoja et al., 2010). This was demonstrated in clinics as well, in healthy volunteers (Brock et al., 2010), in patients with irritable bowel syndrome (Wilder-Smith and Robert-Yap, 2007) and functional dyspepsia (Wilder-Smith et al., 2014).

Up until recently, data about BTX-A's antinociceptive effect in the pelvic region were limited to investigating the effects of local injections on spontaneous visceral pain behavior (Chuang et al., 2004, 2008, 2009). In contrast to that, Coelho et al. (2014) most recently demonstrated, in a model of cyclophosphamide-induced cystitis, the efficacy of i.t. BTX-A injections in reducing mechanical hypersensitivity to the abdominal and hind paw area. Together with our findings, these data reinforce the link between BTX-A and central sensitization, since central BTX-A injections were effective towards referred pain in different models of visceral pain. Considering that the only known target molecule for BTX-A is SNAP-25, we speculate that the inhibition of excitatory neurotransmitter release from the central endings of primary afferent terminals may be responsible for the antinociceptive action of BTX-A. Another possibility is that BTX-A, administered centrally, also inhibits neurotransmitter release from descending fibers, responsible for facilitation of pain transmission and generation of referred somatic and visceral hyperalgesia (Sanoja et al., 2010). Coelho et al. (2014), immunohistochemically found that BTX-A applied i.t. may be anterogradely transported to peripheral nerve endings in the

urinary bladder. The transport from central site to periphery could also contribute to the multifaceted antinociceptive effect of BTX-A in visceral pain.

In conclusion, the presented results provide evidence of antinociceptive effects of intrathecal BTX-A in experimental colitis and peritonitis, including reduction of referred hyperalgesia, one of the most important features of visceral pain, thus supporting predominantly central site of BTX-A antinociceptive action. Furthermore, these results designate BTX-A's potential in treatment of patients with long lasting visceral pain.

## Acknowledgments

We thank Božica Hržan for excellent technical assistance and Željka Gagula for help in performing several experiments. This work was supported by Croatian Ministry of Science, Education and Sport (Project no. 108-1080003-0001 to Z. Lacković).

## References

- Abbott, J.A., Jarvis, S.K., Lyons, S.D., Thomson, A., Vancaille, T.G., 2006. Botulinum toxin type A for chronic pain and pelvic floor spasm in women: a randomized controlled trial. *Obstet. Gynecol.* 108 (4), 915–923.
- Aoki, K.R., 2005. Review of a proposed mechanism for the antinociceptive action of botulinum toxin type A. *Neurotoxicology* 26 (5), 785–793.
- Bach-Rojecky, L., Lacković, Z., 2005. Antinociceptive effect of botulinum toxin type A in a rat model of carrageenan and capsaicin induced pain. *Croat. Med. J.* 46, 201–208.
- Bach-Rojecky, L., Lacković, Z., 2009. Central origin of the antinociceptive action of the botulinum toxin type A. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 94, 234–238.
- Bach-Rojecky, L., Šalković-Petrišić, M., Lacković, Z., 2010. Botulinum toxin type A reduces pain hypersensitivity in experimental diabetic neuropathy: bilateral effects after unilateral injection. *Eur. J. Pharmacol.* 633, 10–14.
- Brock, C., Andresen, T., Frøkjaer, J.B., Gale, J., Olesen, A.E., Arendt-Nielsen, L., Drewes, A.M., 2010. Central pain mechanisms following combined acid and capsaicin perfusion of the human oesophagus. *Eur. J. Pain* 14 (3), 273–281.
- Cervero, F., 2000. Visceral pain—central sensitization. *Gut* 47 (Suppl IV), iv56–iv57.
- Chuang, Y.C., Yoshimura, N., Huang, C.C., Chiang, P.H., Chancellor, M.B., 2004. Intravesical botulinum toxin A administration produces analgesia against acetic acid induced bladder pain responses in rats. *J. Urol.* 172, 1529–1532.
- Chuang, Y.C., Yoshimura, N., Huang, C.C., Wu, M., Chiang, P.H., Chancellor, M.B., 2008. Intraprostatic botulinum toxin A injection inhibits cyclooxygenase-2 expression and suppresses prostatic pain on capsaicin induced prostatitis model in rat. *J. Urol.* 180, 742–748.
- Chuang, Y.C., Yoshimura, N., Huang, C.C., Wu, M., Chiang, P.H., Chancellor, M.B., 2009. Intravesical botulinum toxin A administration inhibits COX-2 and EP4 expression and suppresses bladder hyperactivity in cyclophosphamide-induced cystitis in rats. *Eur. Urol.* 56, 159–166.
- Chung, S.D., Kuo, Y.C., Kuo, H.C., 2012. Intravesical onabotulinumtoxinA injections for refractory painful bladder syndrome. *Pain Phys.* 15 (3), 197–202.
- Coelho, A., Cruz, F., Cruz, C.D., Avelino, A., 2012. Spread of onabotulinumtoxinA after bladder injection. Experimental study using the distribution of cleaved SNAP-25 as the marker of the toxin action. *Eur. Urol.* 61 (6), 1178–1184.
- Coelho, A., Oliveira, R., Rossetto, O., Cruz, C.D., Cruz, F., Avelino, A., 2014. Intrathecal administration of botulinum toxin type A improves urinary bladder function and reduces pain in rats with cystitis. *Eur. J. Pain* 18 (10), 1480–1489.
- Cui, M., Khanjoui, S., Rubino, J., Aoki, K.R., 2004. Subcutaneous administration of botulinum toxin A reduces formalin-induced pain. *Pain* 107 (1–2), 125–133.
- Davis, M.P., 2012. Drug management of visceral pain: concepts from basic research. *Pain Res. Treat.* 2012, 265605.
- De Groat, W.C., 1986. Spinal cord projections and neuropeptides in visceral afferent neurons. *Prog. Brain Res.* 67, 165–187.
- Dressler, D., 2013. Botulinum toxin therapy: its use for neurological disorders of the autonomic nervous system. *J. Neurol.* 260 (3), 701–713.
- Drinovac, V., Bach-Rojecky, L., Lacković, Z., 2014. Association of antinociceptive action of botulinum toxin type A with GABA-A receptor. *J. Neural Transm.* 121 (6), 665–669.
- Drinovac, V., Bach-Rojecky, L., Matak, I., Lacković, Z., 2013. Involvement of  $\mu$ -opioid receptors in antinociceptive action of botulinum toxin type A. *Neuropharmacology* 70, 331–337.
- El-Khawand, D., Wehbe, S., Whitmore, K., 2013. Botulinum toxin for conditions of the female pelvis. *Int. Urogynecol. J.* 24 (7), 1073–1081.
- Favre-Guilhard, C., Auguet, M., Chabrier, P.E., 2009. Different antinociceptive effects of botulinum toxin type A in inflammatory and peripheral polyneuropathic rat models. *Eur. J. Pharmacol.* 617, 48–53.
- Filipović, B., Matak, I., Bach-Rojecky, L., Lacković, Z., 2012. Central action of peripherally applied botulinum toxin type A on pain and dural extravasation

- in rat model of trigeminal neuropathy. *PLoS One* 7 (1), e29803. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0029803>.
- Gebhart, G.F., Bielefeldt, K., 2008. Visceral pain (Bushnell, M.C., Basbaum, A.I.). In: Bushnell, A.I., Kaneko, A., Shepherd, G.M., Westheimer, G. (Eds.), *The Senses: A Comprehensive Reference*, Vol 5 Pain. Academic Press, San Diego, pp. 543–570.
- Gottsche, H.P., Yang, C.C., Berger, R.E., 2011. A pilot study of botulinum toxin A for male chronic pelvic pain syndrome. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 45 (1), 72–76.
- Jabbari, B., Machado, D., 2011. Treatment of refractory pain with botulinum toxins—an evidence-based review. *Pain Med.* 12 (11), 1594–1606.
- Jhang, J.F., Jiang, Y.H., Kuo, H.C., 2014. Potential therapeutic effect of intravesical botulinum toxin type A on bladder pain syndrome/interstitial cystitis. *Int. J. Urol. Suppl.* 1, S49–S55.
- Koster, R., Anderson, M., De Beer, E.J., 1959. Acetic acid for analgesic screening. *Fed. Proc.* 18, 412.
- Kuo, H.C., 2013. Repeated intravesical onabotulinumtoxinA injections are effective in treatment of refractory interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *Int. J. Clin. Pract.* 67 (5), 427–434.
- Laird, J.M., Martínez-Caro, L., García-Nicas, E., Cervero, F., 2001. A new model of visceral pain and referred hyperalgesia in the mouse. *Pain* 92 (3), 335–342.
- Lim, S.J., Park, H.J., Lee, S.H., Moon, D.E., 2010. Ganglion impar block with botulinum toxin type a for chronic perineal pain – a case report. *Korean J. Pain* 23 (1), 65–69.
- Maradey-Romero, C., Fass, R., 2014. New therapies for non-cardiac chest pain. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 16 (6), 390.
- Matak, I., Bach-Rojecky, L., Filipović, B., Lacković, Z., 2011. Behavioral and immunohistochemical evidence for central antinociceptive activity of botulinum toxin A. *Neuroscience* 186, 201–207.
- Matak, I., Riederer, P., Lacković, Z., 2012. Botulinum toxin's axonal transport from periphery to the spinal cord. *Neurochem. Int.* 61, 236–239.
- Matak, I., Lacković, Z., 2014. Botulinum toxin A, brain and pain. *Progr. Neurobiol.* 119–120C, 39–59.
- Ness, T.J., 1999. Models of visceral nociception. *ILAR J.* 40 (3), 119–128.
- Pavone, F., Luvisetto, S., 2010. Botulinum neurotoxin for pain management: insights from animal models. *Toxins* 2 (12), 2890–2913.
- Pinto, R., Lopes, T., Silva, J., Silva, C., Dinis, P., Cruz, F., 2013. Persistent therapeutic effect of repeated injections of onabotulinum toxin a in refractory bladder pain syndrome/interstitial cystitis. *J. Urol.* 189 (2), 548–553.
- Pitcher, M.H., Nieto, F.R., Cervero, F., 2013. Stimulation of cutaneous low threshold mechanoreceptors in mice after intracolonic capsaicin increases spinal c-Fos labeling in an NKCC1-dependent fashion. *J. Pain* 14 (1), 57–65.
- Russell, A., Kavia, R., Dasgupta, P., Sahai, A., 2013. The use of botulinum toxin for the treatment of urologic pain. *Curr. Opin. Urol.* 23 (6), 570–578.
- Sanoja, R., Tortorica, V., Fernandez, C., Priceb, T.J., Cervero, F., 2010. Role of RVM neurons in capsaicin-evoked visceral nociception and referred hyperalgesia. *Eur. J. Pain* 14 (2), 120.e1–120.e9.
- Sengupta, J.N., 2009. Visceral pain: the neurophysiological mechanism. *Handb. Exp. Pharmacol.* 194, 31–74.
- Sugiura, Y., Tonosaki, Y., 1995. Spinal organization of unmyelinated visceral afferent fibers in comparison with somatic afferent fibers. In: Gebhart, C.F. (Ed.), *Progress in Pain Research and Management*. IASP Press, Seattle, pp. 41–59.
- Smith, C.P., Radziszewski, P., Borkowski, A., Somogyi, G.T., Boone, T.B., Chancellor, M. B., 2004. Botulinum toxin a has antinociceptive effects in treating interstitial cystitis. *Urology* 64 (5), 871–875.
- Traub, R.J., 2003. Sensitization in Visceral Pain and Hyperalgesia. *Semin. Pain Med.* 1 (3), 150–158.
- Wilder-Smith, C.H., Li, X., Shen, L., Cao, Y., Ho, K.Y., Wong, R.K., 2014. Dysfunctional endogenous pain modulation in patients with functional dyspepsia. *Neurogastroenterol. Motil.* 26 (4), 489–498.
- Wilder-Smith, C.H., Robert-Yap, J., 2007. Abnormal endogenous pain modulation and somatic and visceral hypersensitivity in female patients with irritable bowel syndrome. *World J. Gastroenterol.* 13 (27), 3699–3704.
- Zermann, D., Ishigooka, M., Schubert, J., 2000. Perisphincteric injection of botulinum toxin type A. A treatment option for patients with chronic prostatic pain? *Eur. Urol.* 38 (4), 393–399.
- Zimmermann, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16 (2), 109–110.

## **PRILOG IV**

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

## Antinociceptive action of botulinum toxin type A in carrageenan-induced mirror pain

V. Drinovac Vlah<sup>1</sup> · L. Bach-Rojecky<sup>1</sup> · Z. Lacković<sup>2</sup>

Received: 4 June 2016 / Accepted: 2 August 2016  
© Springer-Verlag Wien 2016

**Abstract** “Mirror pain” or mirror-image pain (MP) is pain opposite to the side of injury. Mechanism and frequency in humans are not known. There is no consent on therapy. Here we report that unilaterally injected botulinum toxin type A (BT-A) has bilateral effect in experimental MP, thus deserves to be investigated as therapy for this condition. We examined the localization of BT-A’s bilateral antinociceptive action in MP induced by 3 % carrageenan intramuscular injection in Wistar rats. BT-A was applied peripherally (5 U/kg), into ipsilateral or contralateral hind paw pad (i.pl.) and centrally (1 U/kg), at spinal (intrathecally, i.t.) or supraspinal (intracisternally, i.c.) level. Additionally, we examined the involvement of central opioid and GABAergic systems, as well as the contribution of peripheral capsaicin-sensitive neurons to BT-A’s bilateral antinociceptive effect. Ipsilateral i.pl. and i.t. BT-A reduced the bilateral mechanical sensitivity to von Frey filaments, while contralateral i.pl. and i.c. treatments had no effect on either tested side. Bilateral antinociceptive effect of ipsilateral i.pl. BT-A was prevented by  $\mu$ -opioid antagonist naloxonazine (1.5  $\mu$ g/10  $\mu$ l) and GABA<sub>A</sub>

antagonist bicuculline (1  $\mu$ g/10  $\mu$ l) if applied at the spinal level, in contrast to supraspinal application of the same doses. Local treatment of sciatic nerve with 2 % capsaicin 5 days following BT-A i.pl. injection caused desensitization of sciatic capsaicin-sensitive fibers, but did not affect bilateral antinociceptive effect of BT-A and the presence of cleaved SNAP-25 at the spinal cord slices. Present experiments suggest segmental actions of peripheral BT-A at spinal level, which are probably not solely dependent on capsaicin-sensitive neurons.

**Keywords** Botulinum toxin A · Mirror pain ·  $\mu$ -opioid antagonist · GABA<sub>A</sub> antagonist · Capsaicin-sensitive neurons · Cleaved SNAP-25

### Abbreviations

BT-A	Botulinum toxin type A
B	Bicuculline
N	Naloxonazine
SNAP-25	Synaptosomal Associated Protein of 25 kDa
clSNAP-25	Cleaved SNAP-25
MP	Mirror pain
ASIC3	Acid-sensing ion channel 3
CGRP	Calcitonin gene-related polypeptide
SP	Substance P
GABA	$\gamma$ -aminobutyric acid
TRPV1	Transient receptor potential vanilloid type 1
CFA	Complete Freund’s adjuvant
IoNC	Infraorbital nerve constriction
CSF	Cerebrospinal fluid
DRG	Dorsal root ganglion
RVM	Rostral ventromedial medulla
TNC	Trigeminal nucleus caudalis
TENS	Transcutaneous electric nerve stimulation
i.m.	Intramuscular

✉ L. Bach-Rojecky  
lbach@pharma.hr  
V. Drinovac Vlah  
vdrinovac@gmail.com  
Z. Lacković  
lac@mef.hr

<sup>1</sup> Department of Pharmacology, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

<sup>2</sup> Laboratory of Molecular Neuropharmacology, Department of Pharmacology and Croatian Brain Research Institute, University of Zagreb School of Medicine, Šalata 11, 10000 Zagreb, Croatia



i.pl.	Intraplantar
i.t.	Intrathecal
i.c.	Intracisternal
i.c.v.	Intracerebroventricular
PBS	Phosphate-buffered saline
PBST	Triton X-100 in phosphate buffered saline
NGS	Normal goat serum

## Introduction

“Mirror pain” or “mirror-image pain” (MP) is a phenomenon in which unilateral injury results in bilateral pain sensation. Contralateral mirror-imaging has been experimentally demonstrated in a variety of injuries in laboratory animals: inflammatory cutaneous and joint (reviewed in Shenker et al. 2003), inflammatory and non-inflammatory muscle (Sluka et al. 2001; Sluka 2002; Radhakrishnan et al. 2003) and neuropathic (reviewed in Koltzenburg et al. 1999). Altered contralateral sensory perception after unilateral injury or in chronic pain syndromes is reported as well in clinics (Huge et al. 2008; de la Llave-Rincón et al. 2009; Fernández-de-las-Peñas et al. 2009; Konopka et al. 2012; Werner et al. 2013). However, the frequency of this disorder in humans is not known. Treatment varies from case to case and there is no consent. Based on experimental research, it is speculated that mechanisms of contralateral spread of pain involve yet unidentified spinal neural pathways (reviewed by Koltzenburg et al. 1999; Shenker et al. 2003; Huang and Yu 2010; Jancalek 2011) with critical contribution of deregulated supraspinal descending pathways (Tillu et al. 2008; Radhakrishnan and Sluka 2009). Antinociceptive effect of botulinum toxin type A (BT-A) was investigated in several MP models such as non-inflammatory muscle pain induced by repeated acidic saline intramuscular injection (Bach-Rojecky and Lacković 2009), trigeminal neuropathy induced by unilateral infraorbital nerve constriction injury (IoNC) (Filipović et al. 2012) and inflammatory pain induced by complete Freund’s adjuvant (CFA) injection into temporomandibular joint (Lacković et al. 2016). Consistently, the bilateral reduction of pain was observed following BT-A’s unilateral peripheral application. The same effect was demonstrated in poly-neuropathic states evoked by systemic paclitaxel (Favre-Guilmard et al. 2009) or streptozotocin (Bach-Rojecky et al. 2010), as well. As a molecule which comprises proteolytic activity against synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25), part of machinery necessary for neuroexocytosis (Jahn and Fasshauer 2012), BT-A inhibits neurotransmitter release and other possible presynaptic events mediated by SNAP-25 activity (Matak and Lacković 2014). In contrast to beneficial effects at hyperactive neuromuscular junctions and autonomous synapses,

where locally applied BT-A cleaves SNAP-25, hyperalgesia and allodynia resulting from hyperactive nociceptive pathways is most probably reversed by SNAP-25 cleavage at central synapses (Matak and Lacković 2014), to where BT-A could be transported from the periphery by capsaicin-sensitive neurons, as recently demonstrated in trigeminal innervation area (Matak et al. 2014). At central synapses BT-A is proposed to inhibit release of excitatory neurotransmitters from primary afferent terminals in dorsal horn of the spinal cord, such as glutamate, calcitonin gene-related polypeptide (CGRP) and substance P (SP) (Pavone and Luvisetto 2010). Our group was the first to show that antinociceptive action of peripheral BT-A can be blocked by intrathecally delivered opioid and GABA<sub>A</sub> antagonist (Drinovac et al. 2013, 2014), indicating that modulation of spinal inhibitory neurotransmitter systems might be an important component of central antinociceptive activity of BT-A. Still, the exact mechanism, as well as the localization of central antinociceptive effect is far from clear.

Hence, in attempt to further characterize BT-A’s bilateral antinociceptive effect, in the present study using a model of MP induced by intramuscular 3 % carrageenan injection, we investigated: (1) site of its action, (2) involvement of spinal or supraspinal opioid and GABAergic systems, and (3) if peripheral capsaicin-sensitive neurons contribute to its bilateral antinociceptive effect.

## Materials and methods

### Animals

A total number of 200 male Wistar rats (Department of Pharmacology, University of Zagreb School of Medicine, Croatia), housed in a 12 h light/dark cycle with free access to food and water, in groups of 3 rats per cage, were used in experiments. 3-month-old animals weighted average 350 g at the beginning of experiments. Experiments were performed according to 2010/63/EU Directive on the protection of animals used for scientific purposes and recommendations of the International Association for the Study of Pain (Zimmermann 1983). Animal treatment and experimental protocol involving animals is described according to the ARRIVE guidelines. Experiments were approved by the Ethical Committee of the University Of Zagreb School Of Medicine (permit No. 07-76/2005-43).

### Substances

Following substances were used: BT-A (Botox<sup>®</sup>, Allergan, Inc., Irvine, USA); naloxonazine (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA); ethanol (T.T.T., Zagreb, Croatia);  $\lambda$ -

carrageenan, capsaicin, bicuculline, Tween80 and chloral hydrate were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Applied doses and preparation of respective solutions are described in the text below.

For immunohistochemistry we used: Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); normal goat serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); rabbit polyclonal antibody to cleaved SNAP-25 (produced by O.R.); rabbit polyclonal antibody to CGRP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); Fluorogel® (EMS, Hatfield, PA, USA); goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 and 555 (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

### Induction of MP and behavioral testing

100 µL of 3 % λ-carrageenan dissolved in saline (0.9 % NaCl) was injected into the right gastrocnemius muscle (i.m.) of conscious, gently restrained rats (Radhakrishnan et al. 2003). Control animals were injected with saline.

Behavioral assessment of right and left hind paw sensitivity to mechanical stimulation (paw withdrawal threshold, PWT) was performed using a series of von Frey filaments (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) ranging 0.4–26 g. Animals were habituated to the testing area (plastic cage with a wire mesh floor) for 30 min. Filaments were applied in Chaplan's up-down method (Chaplan et al. 1994). Each filament was applied 3 times, kept in bent position for 2 s, with an inter-stimulus interval of 5–10 s (Drinovac et al. 2013). The lowest filament that elicited a withdrawal response was considered the threshold stimulus. Defensive hind paw movement was regarded as a positive response.

Around 80 % of initially treated animals developed bilateral secondary mechanical hypersensitivity ( $\leq 6$  g threshold at both sides) 2 weeks following i.m. carrageenan treatment. Only those animals were included in further

experiments. No mortality of animals occurred in the course of the study. Each experimental group contained six animals. In the following text, term ipsilateral denotes the right, pain induction side, while contralateral refers to the left side, opposite to pain induction.

### Pharmacological treatments of animals with developed MP

Table 1 contains the summarized data of pharmacological treatments used in the present study. Doses and volumes of substances administered at the different sites and the time points at which behavioral measurement was done is chosen based on our previously published research or as described in the literature and shown in a Table 1. Based on our previous experience, local application of BT-A in muscle causes muscle paralysis and complicates nociceptive measurement. Accordingly, in this study we have used subcutaneous route in hind paws as a peripheral site of application. As well, because of difficulties in nociceptive measurement due to different pharmacokinetic properties of bicuculline and naloxonazine, we have chosen different supraspinal routes of administration for the respective antagonists. Naloxonazine, owing to irreversible binding to  $\mu$ -opioid receptors 24 h following application (Ling et al. 1986), was applied i.c.v. under deep general anesthesia and nociceptive measurements using von Frey filaments were performed the next day, allowing full recovery of animals. Bicuculline, due to very short in vivo half-life (<1 h) (Gale and Casu 1981), could not be applied i.c.v., so i.c. administration was used which was performed under short inhalational anesthesia, allowing the nociceptive measurement to be done within 1 h.

All drugs except capsaicin were dissolved in 0.9 % saline. Capsaicin was dissolved in 10 % Tween80 and 10 % ethanol in saline. 1 unit (1 U) of BT-A corresponds to 48 pg of purified *C. botulinum* neurotoxin A complex.

**Table 1** Pharmacological treatments of animals that developed MP 2 weeks following i.m. 3 % carrageenan injection

Substance	Administration	Dose	Volume (µL)	Nociceptive measurement (days after treatment)	References
BT-A	i.pl. ipsilateral	5 U/kg	20	5 days	Bach-Rojecky and Lacković (2009); Drinovac et al. (2014)
BT-A	i.pl. contralateral	5 U/kg	20	5 days	
BT-A	i.t.	1 U/kg	10	1 day	Pertovaara (1988); Matak et al. (2014)
BT-A	i.c.	1 U/kg	10	1 day	
Capsaicin	perisciatic	2 %	/	7 days	
Naloxonazine	i.t.	1.5 µg	10	1 day	
Naloxonazine	i.c.v.	1.5 µg	5	1 day	Drinovac et al. (2013)
Bicuculline	i.t.	1 µg	10	30 min	
Bicuculline	i.c.	1 µg	10	30 min	

*i.pl.* intraplantar, *i.t.* intrathecal, *i.c.* intracisternal, *i.c.v.* intracerebroventricular



For each type of pharmacological treatment, animals in respective control groups received 0.9 % saline or vehicle (if treated with capsaicin). Substance or saline/vehicle administration is performed as described:

- (a) Intraplantarly (i.pl.): subcutaneously into the plantar surface of the right or left hind paw to conscious, gently restrained animals.
- (b) Intrathecally (i.t.): at the lumbar L4/L5 level to anesthetized animals. A small skin incision (2 cm) was made at the lumbar L4/L5 level, substance or saline was injected (27G Tuberculin syringe) between the vertebrae and the skin was sutured (Drinovac et al. 2013). Correctness of application was verified by the animal's tail or hind limb brisk move.
- (c) Intracisternally (i.c.): into the cisterna magna, through a needle (27G Tuberculin syringe) carefully advanced between the occipital protuberance and the spine of the atlas, to anesthetized animals (Drinovac et al. 2014). Correctness of application was verified by extraction of a small amount of cerebrospinal fluid (CSF).
- (d) Intracerebroventricular (i.c.v.): into lateral cerebral ventricles, according to previously described procedure (Noble et al. 1967) in anesthetized animals. Small skin incision (1 cm) was performed at the top of the animal's head and 1 mm opening in both parietal bones, 1.5–2 mm diagonal from sagittal and coronal suture intersection, was drilled (NSK Ultimate XL, Hoffman Estates, IL, USA). Total dose of applied substances was divided and in equal volumes applied with Hamilton syringe (MICROLITER syringe 10  $\mu$ L, Hamilton, Höchst, Germany), set on 4 mm depth, in both ventricles.
- (e) Perisciatic: The right sciatic nerve of anesthetized animals was exposed in the thigh. A cotton ball soaked in 2 % capsaicin or vehicle was placed on the exposed right sciatic nerve for 15 min. The skin was sutured and animals were allowed to recover (Perovaara 1988; Matak et al. 2014).

## Experimental protocol

### *Experiment 1: Investigation of localization of BT-A's antinociceptive effect*

We tested four different ways of BT-A application in animals with chronic MP:

- (a) i.pl. to ipsilateral hind paw; (b) i.pl. to contralateral hind paw; (c) i.t. and (d) i.c. For each BT-A treatment, a group of animals was injected with the same volume of saline to test possible effects of the respective way of application on mechanical thresholds.

### *Experiment 2: Examination of involvement of central opioid and GABAergic neurotransmitter systems in BT-A' antinociceptive effect*

In this experiment, the effects of spinally or supraspinally applied selective  $\mu$ -opioid antagonist naloxonazine (N) and selective GABA<sub>A</sub> antagonist bicuculline (B) were assessed in animals with MP treated with ipsilateral i.pl. BT-A or saline. 5 days following BT-A or saline application, the same dose of naloxonazine was applied i.t. or i.c.v., and sensitivity to von Frey filaments was assessed the next day (Ling et al. 1986), while mechanosensitivity after i.t. or i.c. bicuculline was tested after 30 min (Drinovac et al. 2014).

### *Experiment 3: Investigation of contribution of peripheral capsaicin-sensitive neurons to BT-A's effect*

Ipsilateral sciatic nerve was locally treated either with 2 % capsaicin or with vehicle, as described in previous section, 5 days following ipsilateral i.pl. BT-A (5 U/kg) application to animals with MP (the time point in which antinociceptive effect of BT-A, as well as the cleaved SNAP-25 in the CNS is expected to occur) (Matak et al. 2011). To verify if the described perisciatic treatment desensitized capsaicin-sensitive afferent neurons, in a preliminary experiment we injected pro-algesic 0.1 % capsaicin i.pl. into the right hind paw pad.

The experimenter was unaware of the treatment groups in all experiments.

## Immunohistochemical analysis

Deeply anesthetized animals from the experiment 3 (chloral hydrate 300 mg/kg intraperitoneally) were transcardially perfused with saline and 4 % paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS). Spinal cord tissue was excised and placed in paraformaldehyde fixative containing 15 % sucrose, followed by 30 % sucrose in PBS. The samples were stored at -80 °C until further use (Drinovac et al. 2013). 40  $\mu$ m thick lumbar spinal cord sections (L3–L5), cryostat-cut (Leica, Germany), were collected for free floating in PBS with 0.25 % Triton X-100 (PBST), washed and blocked with 10 % normal goat serum (NGS) in PBST. Sections were incubated overnight at room temperature in 1 % NGS with 1:1700 rabbit polyclonal antibody to cleaved SNAP-25 (cSNAP-25) or rabbit polyclonal antibody to CGRP. The antibody to cSNAP-25 is previously characterized and recognizes specifically the BT-A-cleaved SNAP-25 (Antonucci et al. 2008; Matak et al. 2011). The next day, sections were incubated 2 h with fluorescent secondary antibody 1:300 goat anti-rabbit Alexa Fluor 555 (for cSNAP-25) or 1:400 goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (for CGRP), washed, mounted on microscope slides and

covered with anti-fading agent Fluorogel<sup>®</sup>. Sections from four animals per group (eight sections per animal) were examined. Immunostained sections were visualized with Olympus BX-51 fluorescent microscope coupled to DP-70 digital camera (Olympus, Tokyo, Japan). Images were processed for brightness and contrast with Adobe Photoshop.

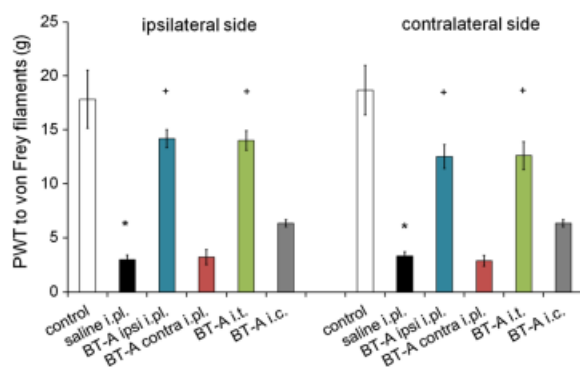
### Statistical analysis

Results, presented as mean  $\pm$  SEM, were analyzed by ANOVA one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test (StatSoft 10 Statistica Enterprise).  $p < 0.05$  was considered significant.

## Results

### Peripheral and spinal, but not supraspinal BT-A reduces MP induced by i.m. carrageenan injection

Two weeks following i.m. carrageenan injection animals developed bilateral hypersensitivity, measured as decreased mechanical threshold on both hind paws ( $p < 0.01$ ). BT-A (5 U/kg) applied i.pl., ipsilaterally to i.m. carrageenan, after 5 days increased mechanical threshold on both sides ( $p < 0.01$ ). In contrast, BT-A applied in the same dose opposite to pain induction had no effect on pain on either side (Fig. 1). Bilateral reduction of mechanical hypersensitivity to von Frey filaments ( $p < 0.01$ ) was also

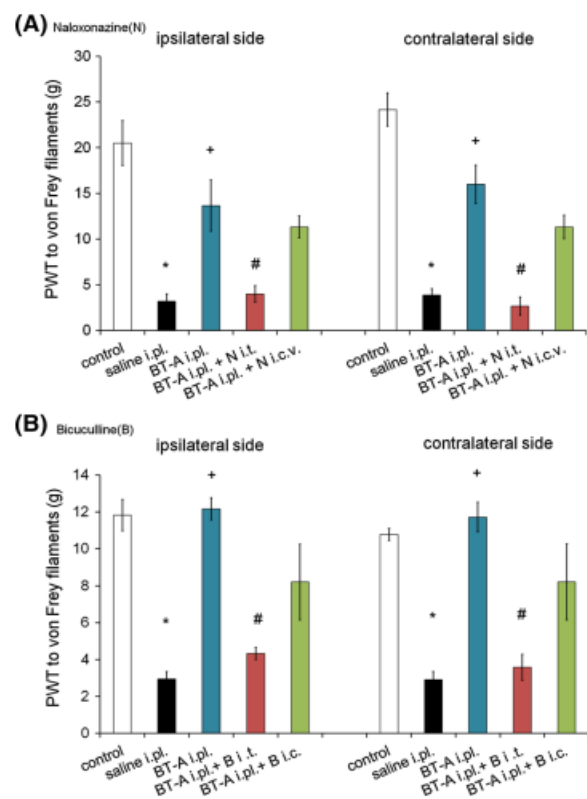


**Fig. 1** The effect of BT-A on MP caused by i.m. carrageenan. BT-A (5 U/kg) was injected peripherally, i.pl. into right (ipsilateral to carrageenan) or left hind paw (contralateral to carrageenan) and centrally, i.t. or i.c. (1 U/kg) 14 days after unilateral i.m. carrageenan injection. Mechanical sensitivity was measured at both hind paws using von Frey filaments 5 days following BT-A peripheral and 1 day following BT-A central treatments. Control = i.m. saline treated animals; all other groups = i.m. carrageenan treated animals. Results are presented as mean  $\pm$  SEM ( $N = 6$ ). \* $p < 0.01$  compared to control; + $p < 0.01$  compared to saline i.pl. One way ANOVA followed by Tukey post hoc

observed 1 day following BT-A (1 U/kg) i.t. administration. However, when applied in the cerebellomedullary cistern, BT-A had no effect on either tested side.

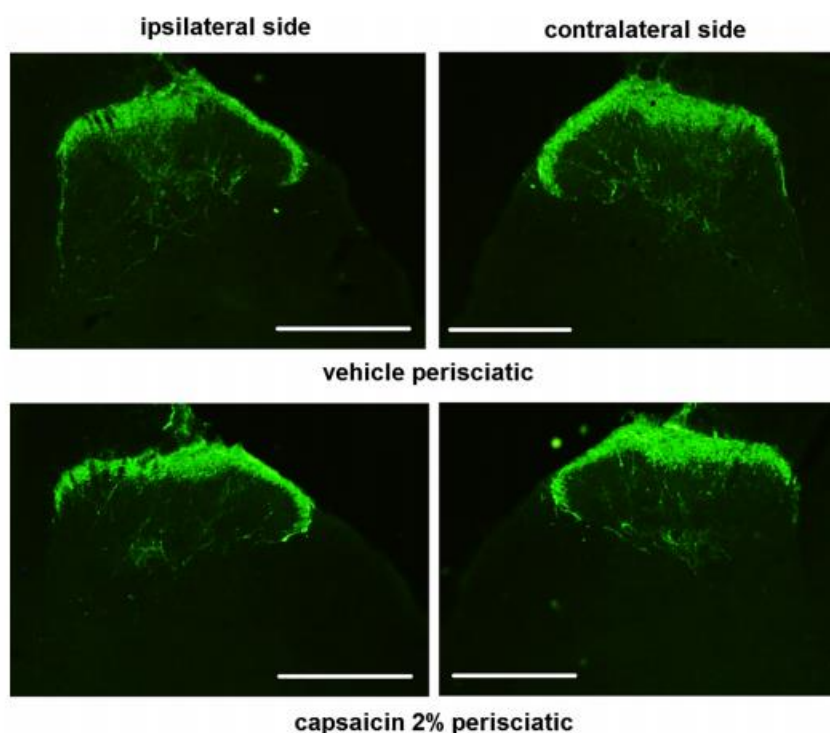
### Bilateral antinociceptive effect of BT-A involves interaction with opioid and GABAergic system at the spinal level

Intrathecal low dose of selective  $\mu$ -opioid antagonist naloxonazine (1.5  $\mu$ g) abolished the bilateral antinociceptive effect of BT-A ( $p < 0.01$  on both sides) (Fig. 2a). In contrast, the same dose of naloxonazine injected i.c.v. had no effect on BT-A's bilateral action. Tested dose of naloxonazine alone, either i.t. or i.c.v., had no effect on carrageenan-induced bilateral mechanical hypersensitivity to von Frey filaments.



**Fig. 2** Bilateral antinociceptive effect of BT-A in i.m. carrageenan-induced MP involves interaction with spinal opioid and GABAergic system. Measurement of mechanical sensitivity to von Frey filaments was performed 5 days following BT-A (5 U/kg, ipsilateral i.pl.) and: **a** 24 h following naloxonazine (1.5  $\mu$ g) i.t. or i.c.v. application; **b** 30 min following bicuculline (1  $\mu$ g) i.t. or i.c. application in animals with developed bilateral pain. Control = i.m. saline treated animals; all other groups = i.m. carrageenan treated animals. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $N = 6$ ). \* $p < 0.01$  compared to control; + $p < 0.01$  compared to saline i.pl.; # $p < 0.01$  compared to BT-A i.pl. One way ANOVA followed by Tukey post hoc

**Fig. 3** The effect of ipsilateral perisciatic 2 % capsaicin application on the CGRP content in the L4 lumbar dorsal horn of the spinal cord. Fluorescent images of CGRP (green immunoreactivity). *N* (animals per group) = 4 (8 sections were examined per each animal). Scale bar 50  $\mu$ m



Similarly to naloxonazine, intrathecal bicuculline (1  $\mu$ g) applied 30 min prior to nociceptive testing abolished the bilateral antinociceptive action of peripheral BT-A (5 U/kg). However, bicuculline applied into the cisterna magna in the same dose did not affect BT-A's bilateral antinociceptive effect (Fig. 2b). The respective doses of bicuculline alone, applied i.t. or i.c., did not affect pain behavior measured with von Frey filaments (results not shown).

#### **Chemical desensitization of sciatic nerve with 2 % capsaicin has no effect on BT-A's antinociceptive activity**

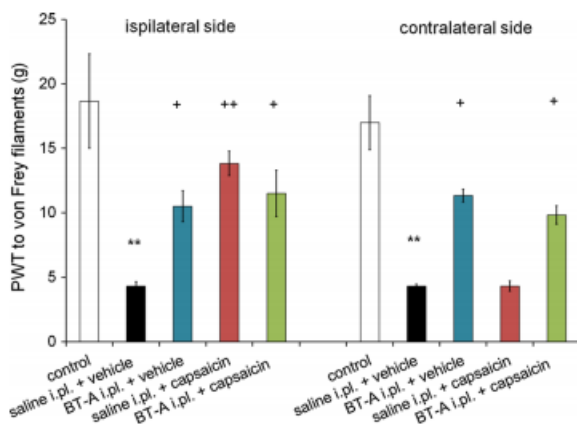
Direct application of 2 % capsaicin to the sciatic nerve selectively desensitized a subset of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) expressing neurons, which was confirmed in preliminary experiment as an absence of acute nocifensive behavior evoked by i.pl. 0.1 % capsaicin injection (results not shown). Acute mechanical sensitivity measured with von Frey filaments was not altered, compared to the opposite side or to vehicle treated animals (results not shown). Qualitative analysis of lumbar L4 segments of the spinal cord revealed no visible difference in CGRP immunoreactive fibers between capsaicin and vehicle perisciatic treatments, indicating that the 2 % capsaicin treatment most probably did not destroy capsaicin-sensitive neurons (Fig. 3).

In rats which developed MP 14 days after i.m. carrageenan injection, capsaicin application on ipsilateral sciatic nerve produced significant antinociceptive effect at that side ( $p < 0.01$ ) but, contrary to BT-A, had no effect on contralateral mechanical hypersensitivity to von Frey filaments (Figs. 1, 4). When applied 5 days after ipsilateral i.pl. BT-A treatment, we observed no synergistic or additive effects on ipsilateral mechanical threshold (Fig. 4). Moreover, capsaicin treatment did not affect BT-A's reduction of contralateral pain (Fig. 4).

#### **Cleaved SNAP-25 in dorsal spinal cord as an evidence of spinal site of BT-A action**

BT-A-cleaved SNAP-25 immunoreactivity (cSNAP-25) appeared in ipsilateral lumbar ventral horns (results not shown), with localization similar as in previous study by Matak et al. (2012), which examined the occurrence of cSNAP-25 after i.pl. BT-A (15 U/kg) injection. In the present study, we observed at least 2 small individual fibers in ipsilateral dorsal horn of the L4 lumbar spinal cord after the i.pl. 5 U/kg BT-A (Fig. 5). The fibers were in most sections observed at the deeper laminae III and IV. We did not observe cSNAP-25 immunoreactive fibers at contralateral dorsal horn (Fig. 5). Seven days following perisciatic 2 % capsaicin treatment truncated SNAP-25

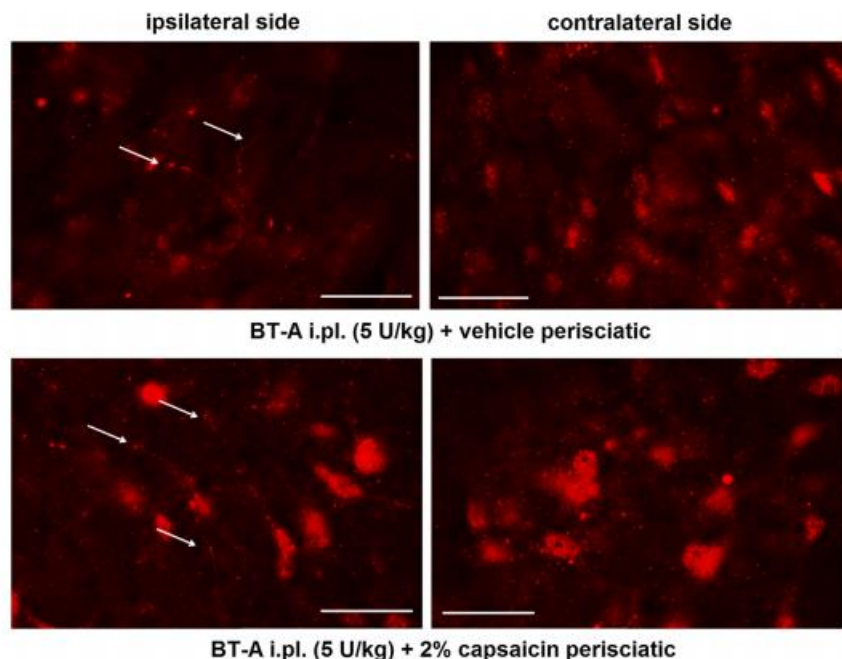




**Fig. 4** Functional impairment of TRPV-1 expressing sciatic nerve neurons with 2 % capsaicin has no effect on BT-A’s antinociceptive activity in MP. Ipsilateral treatment of sciatic nerve with capsaicin results in unilateral antinociceptive effect, while ipsilateral BT-A application has bilateral antinociceptive effect. Five days after i.pl. BT-A (5 U/kg) or saline application, ipsilateral sciatic nerve of rats was treated with 2 % capsaicin or vehicle. PWT to von Frey filaments was examined 7 days after perisciatic treatments at ipsilateral and contralateral hind paw. Control = i.m. saline treated animals; all other groups = i.m. carrageenan treated animals. Results are represented as mean ± SEM (n = 6). \*\*p < 0.01 in comparison to control; +p < 0.05 in comparison to saline i.pl. + vehicle; ++p < 0.01 in comparison to saline i.pl. + vehicle. One way ANOVA followed by Tukey post hoc

immunoreactivity was still present in ipsilateral dorsal spinal cord of BT-A-treated animals, in the similar localization (Fig. 5).

**Fig. 5** Proteolytic activity of BT-A in ipsilateral L4 dorsal horn of the spinal cord is present after the desensitization of sciatic capsaicin-sensitive neurons with high concentration of capsaicin (2 %). Fluorescent images of cSNAP-25 12 days after ipsilateral i.pl. injection of BT-A (5 U/kg) and 7 days following ipsilateral perisciatic 2 % capsaicin. 2 % capsaicin treatment of sciatic nerve 5 days after administration of peripheral BT-A (5 U/kg) did not affect the occurrence of cSNAP-25. Red immunostaining represents cSNAP-25 (arrows) and typically is found in lamina III. N (animals per group) = 4 (8 sections were examined per each animal). Scale bar 20 μm



**Discussion**

“Mirror pain” or mirror-image pain phenomenon is described in many case reports in humans. However, the precise frequency of the disorder was never investigated and the mechanism of its development is not known. Accordingly, the treatments vary from case report to case report, producing only a short lasting pain relief. One of the main features of BT-A, which distinguishes it from other known analgesics is its long-lasting antinociceptive effect after local application (Bach-Rojecky et al. 2005), which is not associated only with site of application, but spreads on distant sites as well (Bach-Rojecky and Lacković 2009; Favre-Guilmond et al. 2009; Bach-Rojecky et al. 2010; Filipović et al. 2012; Lacković et al. 2016). In the present study we aimed to further investigate the bilateral antinociceptive effect of BT-A in less investigated MP model. The results of the present study on experimental MP model indicate that these distant antinociceptive effects might occur at the level of dorsal horn of the spinal dorsal horn, but apparently not at the higher levels of CNS, interfering with spinal opioid and GABAergic systems.

In carrageenan-induced MP model employed in the present study BT-A exerts bilateral antinociceptive effect 5 days after its unilateral i.pl. (5 U/kg) and 1 day following its i.t. injection (1 U/kg) (Fig. 1), similarly as previously demonstrated in repeated acidic saline-induced MP (Bach-Rojecky and Lacković 2009). Additionally, using immunohistochemistry of cleaved SNAP25 we show that

bilateral effect of BT-A occurs after only unilateral enzymatic activity of the toxin in ipsilateral dorsal horn (Fig. 5). Moreover, here we show that BT-A's application in cisterna magna has no effect on bilateral pain, thus suggesting spinal site of its antinociceptive action. However, at present we cannot exclude the possibility that BT-A may not reach deep supraspinal sensory centers after i.c. application. Investigation of cSNAP-25 in brain regions following supraspinal application might provide insight into more firm conclusions about segmental antinociceptive effect of BT-A.

Both models, acidic saline- and carrageenan-induced MP, are developed to study chronic, widespread and neuronally mediated musculoskeletal pain (Radhakrishnan et al. 2004) and share some common characteristics: (1) muscle hyperalgesia lasts for up to 4–8 weeks (Sluka et al. 2001; Radhakrishnan et al. 2003); (2) in addition to primary hyperalgesia at the site of injury, secondary hyperalgesia at distant sites develops (Radhakrishnan et al. 2004); (3) contralateral spread of pain occurs (Sluka et al. 2001; Radhakrishnan et al. 2003); and, in contrast to other chronic pain models, (4) no glial activation is observed and glial inhibitors are not effective in reversing bilateral pain (Ledeboer et al. 2006). Acidic saline and  $\lambda$ -carrageenan activate acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) in primary afferent fibers innervating muscle, which is responsible for the development of secondary mechanical hyperalgesia (Sluka et al. 2003, 2007). However, ASIC3 apparently does not participate in maintenance of MP, since ASIC antagonists are ineffective in reducing MP once it is developed (Gautam et al. 2012). In contrast to, e.g., referred pain from viscera to belonging dermatome, the anatomical background for specific pain at homonymous areas in contralateral limb is not clear, but it favors neurally mediated spinal signaling mechanisms, probably through commissural interneurons, which make synapses between the two sides of spinal cord (Koltzenburg et al. 1999; Jancalek 2011). In addition to spinal mechanisms (Skyba et al. 2002, 2005), sensitization and enhancement of facilitatory descending pathways from the rostral ventrolateral medulla (RVM) was demonstrated to contribute to development, contralateral spread and chronicity of muscle hyperalgesia after acidic saline injections (Ren and Dubner 1996; Radhakrishnan and Sluka 2009; Tillu et al. 2008; Da Silva et al. 2010). MP induced by i.m. carrageenan is assumed to be centrally mediated as well, since the myositis occurs on ipsilateral side only (Radhakrishnan et al. 2003). Additionally, gastrocnemius transcutaneous electric nerve stimulation (TENS) alleviates bilateral pain independently of side of application (Ainsworth et al. 2006). This effect is assumed to be mediated through RVM modulation (Kalra et al. 2001; Desantana et al. 2009). Lack of the effect of BT-A applied into the cisterna magna (Fig. 1) might

suggest that, in contrast to TENS, the antinociceptive action of BT-A may involve segmental spinal circuits only.

In the present study, BT-A applied contralateral to pain induction side failed to reduce hypersensitivity on either side (Fig. 1). This is different from our previous finding in acidic saline model where contralateral BT-A reduced hypersensitivity, but on that side only (Bach-Rojecky and Lacković 2009). This might be explained by differences between the employed models. First, the protocol of induction and the time pattern in which contralateral pain develops is different. In acidic saline model, MP develops 24 h after second injection, while in carrageenan model MP develops 14 days after single injection (Sluka et al. 2001; Radhakrishnan et al. 2003). Second, in contrast to acidic saline which induces MP without any peripheral tissue damage (Sluka et al. 2001; Radhakrishnan et al. 2004),  $\lambda$ -carrageenan causes acute non-immune mediated inflammation in muscle which progresses to chronic one, in time-course that parallels the contralateral development of hyperalgesia (Radhakrishnan et al. 2003). However, in the model where  $\lambda$ -carrageenan was injected into the rat's paw pad, local inflammatory reaction was not affected by BT-A (Bach-Rojecky et al. 2008). Altogether, those differences emphasize the need to investigate different models of MP because of the complex mechanisms.

As demonstrated in our previous studies, the activation of endogenous opioid and GABAergic systems at spinal level, possibly through changes in the respective receptors and/or neurotransmitters, is involved in the central antinociceptive effect of peripherally administered BT-A (Drinovac et al. 2013, 2014). Systemically or intrathecally applied  $\mu$ -opioid antagonist naloxonazine and GABA<sub>A</sub> antagonist bicuculline decreased the antinociceptive effects of i.pl. BT-A on formalin-induced second phase spontaneous pain, as well as on partial sciatic nerve transection-induced mechanical and cold allodynia (Drinovac et al. 2013, 2014). In line with these results, in the present study we showed that i.t. naloxonazine (1.5  $\mu$ g/10  $\mu$ L), as well as bicuculline (1  $\mu$ g/10  $\mu$ L), in doses which had no effect on mechanosensitivity if applied alone, abolished the antinociceptive effect of peripheral BT-A (5 U/kg i.pl.) ipsilaterally and contralaterally to carrageenan injection (Fig. 2). On the contrary, supraspinally applied opioid (i.c.v.) and GABA<sub>A</sub> antagonist (i.c.) failed to affect the i.pl. BT-A's bilateral action, thus suggesting possibility that BT-A interferes with the opioid and GABAergic neurotransmission at the spinal level.

The axonal transport of BT-A from periphery to CNS was demonstrated in behavioral and immunohistochemical experiments using an axonal transport blocker colchicine, which prevented the antinociceptive effect of BT-A along with the occurrence of BT-A-truncated SNAP-25 in dorsal horn of the spinal cord or trigeminal nucleus caudalis



(TNC) (reviewed in Matak and Lacković 2014). More specifically, it is hypothesized that the axonal transport of BT-A might occur through specific subtype of neurons (Matak et al. 2014). In the trigeminal innervation area was demonstrated that destruction of capsaicin-sensitive neurons abolishes the beneficial effect of BT-A in the second phase of the formalin test, as well as the occurrence of cleaved SNAP-25 in TNC (Matak et al. 2014). Thus, it was proposed that axonal transport of BT-A involves capsaicin-sensitive sensory neurons, at least in trigeminal area. Therefore, in the present study we examined if sciatic capsaicin-sensitive neurons contribute to the bilateral antinociceptive effect of i.pl. BT-A. Application of 2 % capsaicin solution locally on sciatic nerve 5 days following BT-A i.pl. injection did not affect bilateral antinociceptive effect of BT-A (Fig. 4). Additionally, cleaved SNAP-25 was still present at the spinal cord slices after the capsaicin treatment (Fig. 5). Contrary to experiments in trigeminal area, where intraganglionic 2 % capsaicin destroyed capsaicin-sensitive neurons (Matak et al. 2014), the same concentration of capsaicin applied locally to the sciatic nerve, produced antinociceptive effect but did not destroy neurons, which was verified qualitatively using immunohistochemistry, where between vehicle and 2 % capsaicin treated animals was not visible difference in spinal lumbar L4 CGRP immunoreactivity (Fig. 3). However, we observed that, in contrast to bilateral effect of i.pl. BT-A (Fig. 4) on MP, the perisciatic capsaicin exerts effect only on the side of application.

Owing to the different effects of i.pl. BT-A (bilateral antinociception) and perisciatic capsaicin (only ipsilateral antinociception) on MP, most likely explanation is that in sciatic innervation area BT-A, in addition to capsaicin-sensitive neurons, may require other types of neurons to achieve bilateral antinociceptive effect. Alternatively, presented results might indicate differences between transport of toxin in trigeminal and sciatic area; however, further studies are needed to confirm this speculation.

## Conclusion

In addition to acidic saline-induced MP, we found bilateral antinociceptive effect of BT-A in a less investigated model of unilateral carrageenan intramuscular injection. BT-A's bilateral antinociceptive effect can be achieved after peripheral ipsilateral and intrathecal, but not intracisternal application. This might indicate that its effects on MP, as well as the interaction with opioid and GABAergic systems, occur at segmental level of the spinal cord. BT-A is the only substance known so far with bilateral effect in different types of experimental MP after unilateral

application. Possible benefit in cases of human bilateral pain might be important to investigate.

**Acknowledgments** We thank Božica Hržan for excellent technical assistance and Ivica Matak for help in performing capsaicin experiment and advices in SNAP-25 immunohistochemistry. This work was supported by Croatian Science Foundation (IP-2014-09-4503), University of Zagreb financial support (Project BM005) and Croatian Ministry of Science, Education and Sports (Project No. 101-1010003-0001).

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** We declare no conflict of interest.

**Ethical approval** All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. Experiments were approved by the Ethical Committee of the University of Zagreb School of Medicine (permit No. 07-76/2005-43).

## References

- Ainsworth L, Budelier K, Clinesmith M, Fiedler A, Landstrom R, Leeper BJ, Moeller L, Mutch S, O'Dell K, Ross J, Radhakrishnan R, Sluka KA (2006) Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) reduces chronic hyperalgesia induced by muscle inflammation. *Pain* 120(1–2):182–187. doi:10.1016/j.pain.2005.10.030
- Antonucci F, Rossi C, Gianfranceschi L, Rossetto O, Caleo M (2008) Long-distance retrograde effects of botulinum neurotoxin A. *J Neurosci* 28(14):3689–3696. doi:10.1523/jneurosci.0375-08.2008
- Bach-Rojecky L, Lacković Z (2009) Central origin of the antinociceptive action of botulinum toxin type A. *Pharmacol Biochem Behav* 94(2):234–238. doi:10.1016/j.pbb.2009.08.012
- Bach-Rojecky L, Relja M, Lacković Z (2005) Botulinum toxin type A in experimental neuropathic pain. *J Neural Transm* 112(2):215–219. doi:10.1007/s00702-004-0265-1
- Bach-Rojecky L, Dominis M, Lacković Z (2008) Lack of anti-inflammatory effect of botulinum toxin type A in experimental models of inflammation. *Fundam Clin Pharmacol* 22(5):503–509. doi:10.1111/j.1472-8206.2008.00615.x
- Bach-Rojecky L, Šalković-Petrišić M, Lacković Z (2010) Botulinum toxin type A reduces pain supersensitivity in experimental diabetic neuropathy: bilateral effect after unilateral injection. *Eur J Pharmacol* 633(1–3):10–14. doi:10.1016/j.ejphar.2010.01.020
- Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 53(1):55–63. doi:10.1016/0165-0270(94)90144-9
- Da Silva LF, Desantana JM, Sluka KA (2010) Activation of NMDA receptors in the brainstem, rostral ventromedial medulla, and nucleus reticularis gigantocellularis mediates mechanical hyperalgesia produced by repeated intramuscular injections of acidic saline in rats. *J Pain* 11(4):378–387. doi:10.1016/j.jpain.2009.08.006
- de la Llave-Rincón AI, Fernández-de-las-Peñas C, Fernández-Carnero J, Padua L, Arendt-Nielsen L, Pareja JA (2009) Bilateral hand/wrist heat and cold hyperalgesia, but not hypoesthesia, in unilateral carpal tunnel syndrome. *Exp Brain Res* 198(4):455–463. doi:10.1007/s00221-009-1941-z



- DeSantana JM, Da Silva LF, De Resende MA, Sluka KA (2009) Transcutaneous electrical nerve stimulation at both high and low frequencies activates ventrolateral periaqueductal grey to decrease mechanical hyperalgesia in arthritic rats. *Neuroscience* 163(4):1233–1241. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.06.056
- Drinovac V, Bach-Rojecky L, Matak I, Lacković Z (2013) Involvement of  $\mu$ -opioid receptors in antinociceptive action of botulinum toxin type A. *Neuropharmacology* 70:331–337. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.02.011
- Drinovac V, Bach-Rojecky L, Lacković Z (2014) Association of antinociceptive action of botulinum toxin type A with GABA-A receptor. *J Neural Transm* 121(6):665–669. doi:10.1007/s00702-013-1150-6
- Favre-Guilhard C, Auguet M, Chabrier PE (2009) Different antinociceptive effects of botulinum toxin type A in inflammatory and peripheral polyneuropathic rat models. *Eur J Pharmacol* 617(1–3):48–53. doi:10.1016/j.ejphar.2009.06.047
- Fernández-de-las-Peñas C, de la Llave-Rincón AI, Fernández-Carnero J, Cuadrado ML, Arendt-Nielsen L, Pareja JA (2009) Bilateral widespread mechanical pain sensitivity in carpal tunnel syndrome: evidence of central processing in unilateral neuropathy. *Brain* 132(Pt 6):1472–1479. doi:10.1093/brain/awp050
- Filipović B, Matak I, Bach-Rojecky L, Lacković Z (2012) Central action of peripherally applied botulinum toxin type A on pain and dural protein extravasation in rat model of trigeminal neuropathy. *PLoS One* 7(1):e29803. doi:10.1371/journal.pone.0029803
- Gale K, Casu M (1981) Dynamic utilization of GABA in substantia nigra: regulation by dopamine and GABA in the striatum, and its clinical and behavioral implications. *Mol Cell Biochem* 39:369–405. doi:10.1007/BF00232586
- Gautam M, Benson CJ, Ranier JD, Light AR, Sluka KA (2012) ASICs do not play a role in maintaining hyperalgesia induced by repeated intramuscular acid injections. *Pain Res Treat* 2012:817347. doi:10.1155/2012/817347
- Huang D, Yu B (2010) The mirror-image pain: an unclered phenomenon and its possible mechanism. *Neurosci Biobehav Rev* 34(4):528–532. doi:10.1016/j.neubiorev.2009.10.011
- Huge V, Lauchart M, Förderreuther S, Kaufhold W, Valet M, Azad SC, Beyer A, Magerl W (2008) Interaction of hyperalgesia and sensory loss in complex regional pain syndrome type I (CRPS I). *PLoS One* 3(7):e2742. doi:10.1371/journal.pone.0002742
- Jahn R, Fasshauer D (2012) Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature* 490(7419):201–207. doi:10.1038/nature11320
- Jancialek R (2011) Signaling mechanisms in mirror image pain pathogenesis. *Ann Neurosci* 18(3):123–127. doi:10.5214/ans.0972-7531.11183010
- Kalra A, Urban MO, Sluka KA (2001) Blockade of opioid receptors in rostral ventral medulla prevents antihyperalgesia produced by transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS). *J Pharmacol Exp Ther* 298(1):257–263
- Koltzenburg M, Wall PD, McMahon SB (1999) Does the right side know what the left is doing? *Trends Neurosci* 22(3):122–127. doi:10.1016/S0166-2236(98)01302-2
- Konopka KH, Harbers M, Houghton A, Kortekaas R, van Vliet A, Timmerman W, den Boer JA, Struys MM, van Wijhe M (2012) Bilateral sensory abnormalities in patients with unilateral neuropathic pain: a quantitative sensory testing (QST) study. *PLoS One* 7(5):e37524. doi:10.1371/journal.pone.0037524
- Lacković Z, Filipović B, Matak I, Helyes Z (2016) Botulinum toxin type A activity in cranial dura: implications for treatment of migraine and other headaches. *Br J Pharmacol* 173(2):279–291. doi:10.1111/bph.13366
- Ledeboer A, Mahoney JH, Milligan ED, Martin D, Maier SF, Watkins LR (2006) Spinal cord glia and interleukin-1 do not appear to mediate persistent allodynia induced by intramuscular acidic saline in rats. *J Pain* 7(10):757–767. doi:10.1016/j.jpain.2006.04.001
- Ling GS, Simantov R, Clark JA, Pasternak GW (1986) Naloxonazine actions in vivo. *Eur J Pharmacol* 129(1–2):33–38. doi:10.1016/0014-2999(86)90333-X
- Matak I, Lacković Z (2014) Botulinum toxin A, brain and pain. *Prog Neurobiol* 119–120:39–59. doi:10.1016/j.pneurobio.2014.06.001
- Matak I, Bach-Rojecky L, Filipović B, Lacković Z (2011) Behavioral and immunohistochemical evidence for central antinociceptive activity of botulinum toxin A. *Neuroscience* 186:201–207. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.04.026
- Matak I, Riederer P, Lacković Z (2012) Botulinum toxin's axonal transport from periphery to the spinal cord. *Neurochem Int* 61(2):236–239. doi:10.1016/j.neuint.2012.05.001
- Matak I, Rossetto O, Lacković Z (2014) Botulinum toxin type A selectivity for certain types of pain is associated with capsaicin-sensitive neurons. *Pain* 155(8):1516–1526. doi:10.1016/j.pain.2014.04.027
- Noble EP, Wurtman RJ, Axelrod J (1967) A simple and rapid method for injecting H3-norepinephrine into the lateral ventricle of the rat brain. *Life Sci* 6(3):281–291. doi:10.1016/0024-3205(67)90157-9
- Pavone F, Luvisetto S (2010) Botulinum neurotoxin for pain management: insights from animal models. *Toxins* 2(12):2890–2913. doi:10.3390/toxins2122890
- Pertovaara A (1988) Collateral sprouting of nociceptive C-fibers after cut or capsaicin treatment of the sciatic nerve in adult rats. *Neurosci Lett* 90(3):248–253. doi:10.1016/0304-3940(88)90197-8
- Radhakrishnan R, Sluka KA (2009) Increased glutamate and decreased glycine release in the rostral ventromedial medulla during induction of a pre-clinical model of chronic widespread muscle pain. *Neurosci Lett* 457(3):141–145. doi:10.1016/j.neulet.2009.03.086
- Radhakrishnan R, Moore SA, Sluka KA (2003) Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. *Pain* 104(3):567–577. doi:10.1016/S0304-3959(03)00114-3
- Radhakrishnan R, Bement MK, Skyba D, Sluka KA, Kehl LJ (2004) Models of muscle pain: carrageenan model and acidic saline model. *Curr Protoc Pharmacol Chapter 5, Unit 5.35*. doi:10.1002/0471141755.ph0535s25
- Ren K, Dubner R (1996) Enhanced descending modulation of nociception in rats with persistent hindpaw inflammation. *J Neurophysiol* 76(5):3025–3037
- Shenker N, Haigh R, Roberts E, Mapp P, Harris N, Blake D (2003) A review of contralateral responses to a unilateral inflammatory lesion. *Rheumatology* 42(11):1279–1286. doi:10.1093/rheumatology/keg397
- Skyba DA, King EW, Sluka KA (2002) Effects of NMDA and non-NMDA ionotropic glutamate receptor antagonists on the development and maintenance of hyperalgesia induced by repeated intramuscular injection of acidic saline. *Pain* 98(1–2):69–78. doi:10.1016/S0304-3959(01)00471-7
- Skyba DA, Lisi TL, Sluka KA (2005) Excitatory amino acid concentrations increase in the spinal cord dorsal horn after repeated intramuscular injection of acidic saline. *Pain* 119(1–3):142–149. doi:10.1016/j.pain.2005.09.025
- Sluka KA (2002) Stimulation of deep somatic tissue with capsaicin produces long-lasting mechanical allodynia and heat hypoalgesia that depends on early activation of the cAMP pathway. *J Neurosci* 22(13):5687–5693
- Sluka KA, Kalra A, Moore SA (2001) Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. *Muscle Nerve* 24(1):37–46

- Sluka KA, Price MP, Breese NM, Stucky CL, Wemmie JA, Welsh MJ (2003) Chronic hyperalgesia induced by repeated acid injections in muscle is abolished by the loss of ASIC3, but not ASIC1. *Pain* 106(3):229–239. doi:[10.1016/S0304-3959\(03\)00269-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(03)00269-0)
- Sluka KA, Radhakrishnan R, Benson CJ, Eshcol JO, Price MP, Babinski K, Audette KM, Yeomans DC, Wilson SP (2007) ASIC3 in muscle mediates mechanical, but not heat, hyperalgesia associated with muscle inflammation. *Pain* 129(1–2):102–112. doi:[10.1016/j.pain.2006.09.038](https://doi.org/10.1016/j.pain.2006.09.038)
- Tillu DV, Gebhart GF, Sluka KA (2008) Descending facilitatory pathways from the RVM initiate and maintain bilateral hyperalgesia after muscle insult. *Pain* 136(3):331–339. doi:[10.1016/j.pain.2007.07.011](https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.07.011)
- Werner MU, Ringsted TK, Kehlet H, Wildgaard K (2013) Sensory testing in patients with postthoracotomy pain syndrome: Part 1: mirror-image sensory dysfunction. *Clin J Pain* 29(9):775–783. doi:[10.1097/AJP.0b013e318277b646](https://doi.org/10.1097/AJP.0b013e318277b646)
- Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16(2):109–110

## **9 ŽIVOTOPIS**

Višnja Drinovac Vlah rođena je 5. svibnja 1986. u Vukovaru. Srednju školu završila je u Osijeku 2005. godine, a u srpnju 2010. godine diplomirala je na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. U rujnu 2011. godine završila je pripravnički staž u ljekarni „Sonja Grbac-Stublić“ u Zagrebu te 13. listopada 2011. položila stručni ispit. Od srpnja 2011. godine radi kao asistentica-znanačvena novakinja na Zavodu za farmakologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. U veljači 2013. godine upisala je poslijediplomski doktorski studij „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu. Članica je Hrvatske ljekarničke komore i Hrvatskog društva farmakologa. Dobitnica je dviju stipendija: DAAD stipendije za istraživački boravak na Klinici za neurologiju Sveučilišne bolnice u Würzburgu u trajanju od mjesec dana (rujan 2014.) te ARRS BI-HR/14-15-032 stipendije za istraživački boravak na Zavodu za kliničku biokemiju Farmaceutskog fakulteta Sveučilišta u Ljubljani u trajanju od 2 mjeseca (lipanj i srpanj 2015.). Rezultate dosadašnjeg znanstvenog rada prezentirala je kroz brojne sažetke i posterska priopćenja na nacionalnim i međunarodnim kongresima. Objavila je 4 CC znanstvena rada, u časopisima prvog i drugog kvartila u kategoriji farmakologije i farmacije.

Popis znanstvenih radova:

1. Drinovac V, Bach-Rojecky L, Matak I, Lacković Z (2013) Involvement of  $\mu$ -opioid receptors in antinociceptive action of botulinum toxin type A. *Neuropharmacology* **70**: 331-337
2. Drinovac V, Bach-Rojecky L, Lacković Z (2014) Association of antinociceptive action of botulinum toxin type A with GABA-A receptor. *J Neural Transm (Vienna)* **121(6)**: 665-669
3. Drinovac V, Bach-Rojecky L, Babić A, Lacković Z (2014) Antinociceptive effect of botulinum toxin type A on experimental abdominal pain. *Eur J Pharmacol* **745**: 190-195
4. Drinovac Vlah V, Bach-Rojecky L, Lacković Z (2016) Antinociceptive action of botulinum toxin type A in carrageenan-induced mirror pain. *J Neural Transm (Vienna)* **123(12)**: 1403-1413

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Doktorski rad

## SREDIŠNJI NEUROTRANSMITORI I MEHANIZAM ANTINOCICEPTIVNOG DJELOVANJA BOTULINUM TOKSINA TIP A

Višnja Drinovac Vlah

### SAŽETAK

Novi dokazi ukazuju da je antinociceptivno djelovanje botulinum toksina tipa A (BT-A) središnjeg porijekla. U ovom doktorskom radu smo provjerili ovu pretpostavku u ranije nedovoljno istraženim oblicima boli, istraživali interakciju sa središnjim neurotransmitorima kao mogući mehanizam djelovanja te pokušali pobliže utvrditi mjesto djelovanja toksina u središnjem živčanom sustavu (SŽS).

Ispitivanja su izvedena na mužjacima Wistar štakora. U upalnoj, neuropatskoj i bilateralnoj mišićnoj boli ispitan je učinak selektivnih i neselektivnih antagonista opioidnih i GABAA receptora, primijenjenih sistemski, spinalno ili supraspinalno, na antinociceptivno djelovanje periferno (supkutano u šapu) primijenjenog BT-A. U tkivu kralješnične moždine ispitana je aktivacija neuronalnih i glija stanica, ekspresija mRNA proupalnih citokina i  $\mu$ -opioidnih receptora te ekspresija Leu/Met-enkefalina metodama imunofluorescencije i lančane reakcije polimerazom s reverznom transkripcijom. Istraživano je antinociceptivno djelovanje BT-A nakon periferne, spinalne i supraspinalne primjene te je imunofluorescencijom ispitana enzimski aktivnost BT-A u tkivu SŽS-a.

Opioidni i GABAA antagonisti su ovisno o dozi, sistemski i intratekalno, ali ne i supraspinalno, poništili antinociceptivno djelovanje BT-A u svim ispitanim modelima. Učinak antagonista bio je kratkotrajan. BT-A je smanjio neuronalnu aktivaciju u dorzalnom rogu kralješnične moždine, što su antagonisti blokirali. BT-A je smanjio bol u dosad neistraženim modelima visceralne boli (peritonitis, kolitis). Bilateralno antinociceptivno djelovanje BT-A posljedica je prisutnosti toksina samo na ipsilateralnoj strani. BT-A je smanjio bol nakon periferne i intratekalne primjene, dok primijenjen supraspinalno (cisterna magna, moždane komore) nije djelovao, unatoč nalazu njegove enzimski aktivnosti u pojedinim regijama mozga uključenima u nocicepciju.

BT-A ima segmentalno antinociceptivno djelovanje spinalnoj razini, uz neizravnu aktivaciju endogenog opioidnog i GABA-ergičkog sustava. Ovi bi nalazi mogli biti važni za klinička ispitivanja potencijalno korisnih sinergističkih interakcija s konvencionalnim analgeticima i drugim lijekovima te usmjeriti klinička ispitivanja na nove indikacije i nove načine primjene, poput intratekalne.

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

Rad sadrži: 153 stranice, 30 grafičkih prikaza, 9 tablica i 251 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: botulinum toksin tipa A, središnje antinociceptivno djelovanje, segmentalno djelovanje na spinalnoj razini, opioidni sustav, GABA-ergički sustav

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

**Dr. sc. Zdravko Lacković**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Medicinskog fakulteta  
Ocjenjivači: **Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Maja Šegvić Klarić**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Melita Šalković-Petrišić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Medicinskog fakulteta.

Rad prihvaćen: travanj, 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

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

Doctoral thesis

### CENTRAL NEUROTRANSMITTERS AND MECHANISM OF ANTINOCICEPTIVE EFFECT OF BOTULINUM TOXIN TYPE A

Višnja Drinovac Vlah

#### SUMMARY

Novel evidence suggests that the antinociceptive effect of botulinum toxin type A (BT-A) is of central origin. In this doctoral thesis, we verified this assumption in previously insufficiently investigated types of pain, investigated the interaction with central neurotransmitters as the possible mechanism of action and tried to determine the site of the toxin's action within the central nervous system (CNS).

Male Wistar rats were used in experiments. We examined the effect of selective and nonselective opioid and GABA<sub>A</sub> antagonists, applied systemically, spinally and supraspinally, on antinociceptive effect of peripherally (subcutaneously into hind paw) applied BT-A in inflammatory, neuropathic, and bilateral pain. Neuronal and glial cells' activation, proinflammatory cytokines' and  $\mu$ -opioid receptors mRNA expression, and Leu/Met-enkephalin protein expression were analyzed using immunofluorescence and quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) in lumbar spinal cord tissue. Further, we investigated the antinociceptive effect of BT-A following peripheral, spinal and supraspinal application. In parallel, enzymatic activity of BT-A in CNS tissue was examined using immunofluorescence.

Opioid and GABA<sub>A</sub> antagonists, applied systemically and intrathecally, dose-dependently abolished the antinociceptive effect of peripheral BT-A in all tested models, while no effect was observed following their supraspinal application. The effect of antagonists was short-lasting. BT-A reduced neuronal activation in dorsal horn, which was abolished by both, opioid and GABA<sub>A</sub> antagonist. BT-A diminished pain in, yet uninvestigated, models of visceral pain (peritonitis and colitis). BT-A's bilateral antinociceptive action occurs after toxin's presence on ipsilateral side only. BT-A reduced pain after peripheral and intrathecal application, but not after application in *cisterna magna* or cerebral ventricles, despite of its enzymatic activity in brain regions involved in nociception.

BT-A has segmental antinociceptive effect at the spinal level, which involves an indirect activation of endogenous opioid and GABA-ergic systems. These findings might guide clinical investigations of potentially useful additive or synergistic effects with conventional analgesics and direct clinical trials for novel indications and the routes of application, like intrathecal.

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

Thesis includes: 153 pages, 30 figures, 9 tables and 251 references. Original is in Croatian language.

Keywords: botulinum toxin type A; central antinociceptive effect, segmental effect at the spinal level, opioid system, GABA-ergic system

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

**Zdravko Lacković, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb School of Medicine

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

**Maja Šegvić Klarić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Melita Šalković-Petrišić, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb School of Medicine

The thesis was accepted: April, 2017.