

Transsinaptički učinci botulinum toksina nakon njegove intramuskularne aplikacije

Vukić, Barbara

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:365845>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Barbara Vukić

**TRANSSINAPTICKI UČINCI BOTULINUM TOKSINA NAKON
NJEGOVE INTRAMUSKULARNE APLIKACIJE**

Diplomski rad



Zagreb, 2021.godina

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Ivice Mataka, u okviru projekta Europskog socijalnog fonda i Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta (HR3.2.01-0178) te je predan na ocjenu u akademskoj godini 2020./2021.

POPIS KRATICA

BoNT/A - Botulinum toksin tip A

DAS - digitalni abdukcijski skor (prema engl., Digital abduction score)

ELISA - enzimski povezani fluorescentni test (prema engl., Enzyme-linked immunosorbent assay)

GABA - gama-aminomaslačna kiselina

GPi - lat. *globus pallidus internus*

i.j. - internacionalne jedinice

i.m. - intramuskularno

i.t. - intratekalno

LD50 - srednja letalna doza (prema engl., median lethal dose)

SNAP-25 - sinaptosomalno povezani protein 25 (prema engl., Synaptosomal-associated protein 25)

SNARE - SNAP receptor (prema engl. SNAP receptor)

SNr - lat. *substantia nigra pars reticulata*

SŽS- središnji živčani sustav

TeNT - Tetanus toksin

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. SAŽETAK | |
| 2. SUMMARY | |
| 3. UVOD | 1 |
| 3.1. POREMEĆAJI POKRETA | 1 |
| 3.2. IZAZOVI LIJEČENJA | 2 |
| 3.3. O BOTULINUM TOKSINU | 2 |
| 3.4. ANIMALNI MODEL SPASTIČNE PARALIZE | 3 |
| 4. HIPOTEZA | 4 |
| 5. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA | 4 |
| 6. MATERIJALI I METODE | 4 |
| 6.1. MATERIJALI- ŽIVOTINJE | 4 |
| 6.2. MATERIJALI- KEMIKALIJE | 5 |
| 6.3. FARMAKOLOŠKI TRETMAN | 5 |
| 6.4. EKSPERIMENTALNI PROTOKOL | 5 |
| 6.5. BIHEVIORALNI TESTOVI MOTORIKE | 6 |
| 6.5.1. Otpor na pasivnu dorzifleksiju gležnja | 7 |
| 6.5.2. DAS- refleks širenja nožnih prstiju | 7 |
| 6.5.3. Basso Beattie Bresnhan skala | 7 |
| 6.6. STATISTIČKA ANALIZA | 10 |
| 7. REZULTATI | 11 |
| 7.1. Primarna indukcija spasticiteta TeNT-om i učinak BoNT/A na animalni model spastične paralize | 11 |
| 7.2. Sekundarna indukcija spasticiteta TeNT-om | 14 |
| 7.3. Tercijarna indukcija spasticiteta TeNT-om | 16 |
| 7.4. Potvrdni eksperiment | 18 |

| | |
|---------------------------|----|
| 8. RASPRAVA | 20 |
| 9. ZAKLJUČCI | 22 |
| 10. ZAHVALE | 22 |
| 11. POPIS LITERATURE..... | 23 |
| 12. ŽIVOTOPIS | 26 |

1. SAŽETAK

TRANSSINAPTIČKI UČINCI BOTULINUM TOKSINA NAKON NJEGOVE INTRAMUSKULARNE APLIKACIJE

Barbara Vukić

Botulinum neurotoksin se koristi za liječenje spasticiteta i hiperkinetičkih poremećaja pokreta. Nedavna istraživanja su pokazala da BoNT/A, osim dobro poznatim perifernim učincima na neuromuskularnoj spojnici, inducira antispastički efekt djelovanjem na centralni živčani sustav. U ovoj studiji ispitali smo ulogu perifernih mišićnih te centralnih spinalnih učinaka BoNT/A na redukciju abnormalno povećanog tonusa mišića u štakorskom modelu lokalnog spasticiteta izazvanog TeNT-om, tijekom produljenog vremenskog razdoblja.

Injekcijom TeNT-a (1.5 ng) u m.gastrocnemius štakora izazvali smo reverzibilnu spastičnu paralizu u trajanju od 3 tjedna. Nakon indukcije mišićnog spazma, aplicirali smo BoNT/A (5 U/kg) u spastični mišić. Životinje su podijeljene u 3 grupe: kontrolna grupa s primljenim TeNT + fiziološka + konjski serum, grupa TeNT + BoNT/A + konjski serum i grupa TeNT + BoNT/A + i.t. botulinum antitoksin.

Videoanalizom i bihevioralnim testovima motorike- mjerenjem otpora na pasivnu dorzifleksiju gležnja, DAS skorom te BBB (Basso Beattie Bresnhan) skalom ocjenjene su motoričke sposobnosti štakora. Studija je provedena slijepo i randomizirano. Dugotrajni učinci BoNT/A ispitani su kroz dulji vremenski period, ponavljanim injekcijama TeNT-induciranog spasticiteta.

Intramuskularna aplikacija BoNT/A uzrokovala je redukciju lokalnog spasticiteta mišića, kojeg obilježava rigidna ekstenzija stražnje noge štakora. Tijekom perioda mlohave paralize (do 14 dana poslije i.m. injekcije BoNT/A), centralni učinci nisu imala utjecaja na antispastičku aktivnostu BoNT/A. Ipak, sekundarnom indukcijom spasticiteta TeNT-om (35 dana poslije BoNT/A), životinje koje su primile antitoksin (čime su onemogućeni centralni učinci) su na bihevioralnim testovima motorike pokazale manju redukciju spasticiteta, za razliku od onih koje nisu primile antitoksin. Tercijarnom indukcijom spasticiteta TeNT-om, ista grupa životinja koja nije primila antitoksin je i dalje pokazivala lokalni spazam manjeg stupnja, radi očigledne mišićne atrofije.

Zaključno, osim perifernih učinaka BoNT/A na razvoj mlohave paralize, centralni učinci neurotoksina dolaze do izražaja dva do tri tjedna nakon aplikacije i uzrokuju redukciju spasticiteta. Konačno, nakon nastupa obiju učinaka dolazi do razvoja mišićne atrofije.

Ključne riječi: Botulinum neurotoksin tip A, centralni učinci, mišićni spasticitet, Tetanus neurotoksin, hiperkinetički poremećaji pokreta

2. SUMMARY

TRANS-SYNAPTIC ACTIONS OF BOTULINUM TOXIN AFTER IT'S INTRAMUSCULAR APPLICATION

Barbara Vukić

Botulinum neurotoxin is used for the treatment of spasticity and hyperkinetic movement disorders. Recent research showed that, besides well-known peripheral action of BoNT/A on neuromuscular junction, the toxin induces an antispastic effect by affecting the central nervous system. In this study we examined the peripheral muscular and central spinal effects of BoNT/A on reduction of abnormal muscle tone in rat model of local spasticity provoked by TeNT, over prolonged observation period.

By injecting TeNT (1.5ng) in m.gastrocnemius of a rat we induced a reversible spastic paralysis lasting for 3 weeks. After induction of muscular spasm, we injected BoNT/A (5 U/kg) into the spastic muscle. Animals were divided in three groups: control group which received TeNT + saline solution + horse serum, group TeNT + BoNT/A + horse serum and group TeNT + BoNT/A + i.t. botulinum antitoxin.

Videoanalysis and bibehavioural motor tests- resistance to passive dorsiflexion of the ankle, DAS score and BBB (Basso Beattie Bresnhan) scale were used to evaluate motor capabilities of rats. The study was blinded and randomized. Longterm effects of BoNT/A were examined over prolonged period of time, by repeated injections of TeNT-induced spasticity.

Intramuscular application of BoNT/A caused reduction of local muscle spasticity, which was characterized by rigid extension of the hind paw. During the period of flaccid paralysis (up to 14 days after i.m. BoNT/A), the central effects didn't influence the antispastic activity of BoNT/A. However, after secondary induction of spasticity by TeNT (up to 35 days post i.m.BoNT/A), animals which received antitoxin (thus disabling central effects) showed lower reduction of spasticity on behavioural motor tests, unlike the ones who didn't receive the antitoxin. After tertiary induction of spasticity by TeNT, same group of animals which didn't receive the antitoxin, still exhibited local spasm of lower degree, apparently due to lasting muscle atrophy.

In conclusion, besides peripheral effects of BoNT/A in development of flaccid paralysis, central effects of this neurotoxin came to the fore 2-3 weeks after peripheral application and

caused reduction of spasticity. Finally, after both effects wore off, lasting muscle atrophy remained.

Keywords: Botulinum neurotoxin type A, central effects, muscle spasticity, tetanus neurotoxin, hyperkinetic movement disorders

3. UVOD

3.1. Poremećaji pokreta

Poremećaji pokreta česti su neurološki poremećaji motorike obilježeni pojavom nevoljnih pokreta ili nemogućnošću izvođenja voljnih pokreta. Dijele se na hiperkinetičke i hipokinetičke poremećaje. Hipokinetičke poremećaje obilježava apsolutni manjak, malobrojnost ili sporost izvođenja pokreta. Najčešći oblik takvog poremećaja jest Parkinsonova bolest, čiji su karakteristični simptomi bradikinezija, rigidnost mišića, gubitak posturalnih refleksa te tremor u mirovanju. Druga krajnost su hiperkinetički poremećaji koje obilježava prekomjerna motorička aktivnost (što značajno ometa bolesnikovo normalno funkcioniranje) te pojava neželjenih, nereguliranih pokreta. Primjer su distonije, atetoz, tortikolis, blefarospazam, koreja, balizam, mioklonizmi, tikovi te esencijalni tremor. Među njima razlikujemo ritmične (tremor) te neritmične poremećaje (koreja, tikovi, balizam i ostali). Svaki od tih poremećaja karakterizira i vrijeme pojavnosti pokreta te njegova brzina (Brinar 2009). U podlozi svih navedenih poremećaja jest abnormalnost u funkcioniranju bazalnih ganglija, duboke sive tvari mozga koja ima ključnu ulogu u regulaciji motoričke aktivnosti.

Bazalne ganglije čini nekoliko supkortikalnih struktura- supstantia nigra, globus pallidum, striatum i subtalamička jezgra. Navedene strukture funkcioniraju prethodno utvrđenim kružnim putevima koji ih povezuju s talamusom, korteksom i moždanim deblom (Alexander i Crutcher 1990). Osim u regulaciji motoričke aktivnosti, bazalni gangliji preko spomenutih puteva, ali i projekcija iz prefrontalnog korteksa, sudjeluju u radu limbičkog i okulomotornog sustava te procesima proceduralnog učenja. Osnova motorike ekstrapiramidnog puta zasniva se na inhibitornim projekcijskim neuronima čija se tijela nalaze u jezgrama GPi i SNr, a sinapse završavaju u motoričkim jezgrama talamusa. Ti neuroni pokazuju izrazitu spontanu aktivnost u mirovanju i time inhibiraju ciljne strukture. Smanjenjem ovih inhibitornih projekcija dolazi do dezinhibicije talamokortikalnih motoričkih puteva, što čini podlogu razvoja hiperkinetičkih poremećaja pokreta.

Iako se poremećaji pokreta mogu prezentirati raznim kliničkim simptomima kao što su emocionalna nestabilnost (DeLong i Thomas 2015), teškoće u procesima pamćenja i učenja (den Dunnen 2013), jedan od najtežih motoričkih simptoma jest spastičnost mišića. Spasticitet se definira kao motorički poremećaj koji karakterizira pretjerani otpor mišića pri pasivnom istezanju (Judaš i Kostović 1997). Kada je spasticitet mišića jedan od simptoma pacijenta oboljelog od hiperkinetičkog poremećaja pokreta, njegova ili njezina kvaliteta života je

narušena (Zorowitz Richard 2013), stoga liječenje tog simptoma predstavlja imperativ. Ipak, danas je najčešći uzrok spasticiteta moždani udar. Iako je pojačan tonus mišića u hiperkinetičkim poremećajima pokreta i spasticitetu različite etiologije, u oba slučaja je povezan s umanjenom inhibitornom kontrolom donjih motoneurona (Hallett i Pisani 2008). Ostali uzroci uključuju oštećenja središnjeg živčanog sustava (mozga i kralježnične moždine) traumom ili drugim patološkim procesom kao što su tumor i multipla skleroza (Brinar 2009).

3.2. Izazovi liječenja

Otkrivanje najboljeg načina liječenja poremećaja pokreta zauzima veliki dio znanstvenih istraživanja današnjice. Liječenje hipokinetskih poremećaja (Parkinsonove bolesti) u današnjoj medicini većinom je usuglašeno- prva terapijska linija su medikamenti (najčešće levodopa), a alternativna jest duboka mozgovna stimulacija (dalje u tekstu DBS) (Tarakad i Jankovic 2017). Međutim, liječenje hiperkinetskih poremećaja još uvijek predstavlja pravi izazov (C Warren Olanow 2009). U tome izazovu prednjači liječenje distonija. Lijekovi (klonazepam, triheksifenidil), intramuskularna primjena botulinum toksina A i B te DBS opcije su liječenja (Batla 2018). Mnoga istraživanja pokazala su zavidnu učinkovitost botulinum toksina u liječenju distonija i sličnih poremećaja hiperspasticiteta (Paula Ruth L, i dr. 2020), (Gerard E, i dr. 2017).

3.3. O botulinum toksinu

Botulinum toksin serotip A neurotoksin je koji sintetizira bakterija *Clostridium botulinum*. Njegovo djelovanje smješteno je na presinaptičkoj razini. Uzrokuje mlohavu paralizu poprečnoprugastih mišića u toksičnim dozama zbog inhibicije otpuštanja acetilkolina na razini neuromuskularne spojnice (Matak, Lacković i Relja 2016). Na molekularnoj razini do sinaptičke blokade dolazi zbog cijepanja sinaptičkog proteina SNAP-25 koji je dio SNARE kompleksa (Caleo, i dr. 2018), (Matak, Bölskei, i dr. 2019). Učinak je BoNT/A dugotrajan zbog toga što se toksin u stanici smješta blizu plazmatske membrane, veže za citoskelet i na taj način nedostupan degradacijskim staničnim proteazama. Također, drugi je mogući razlog produljenog učinka aktivacija enzima koji miču poliubikvitinske lance s toksina te ga proteosomalni sustav ne prepoznaje (Matak, Bölskei, i dr. 2019). Kao što je već rečeno, intramuskularna primjena BoNT/A široko se primjenjuje u liječenju distonija i spasticiteta te se danas zna da je njegov učinak posljedica reverzibilne inhibicije hiperekscitabilnih živčanih završetaka na motoričkoj ploči (Simpson, i dr. 2016), a dugotrajanost učinka je ono što ga čini poželjnim u kliničkoj medicini. Osim učinka BoNT/A na neuromuskularnu spojnicu te

predloženog učinka na intrafuzalna mišićna vlakna, dodatan učinak se ostvaruje i na razini senzornih neurona. Toksin blokira otpuštanje senzornih neuropeptida na razini SNARE kompleksa kao i kod motoričkih živaca (Matak, Bölcskei, i dr. 2019). Time se pokušava objasniti antinociceptivni učinak BoNT/A koji je uspješno iskorišten u terapiji neuropatske boli, kao što su trigeminalna neuralgija, migrena, dijabetička neuropatija, postherpetična neuralgija i brojne druge tvrdokorne boli.

Svi ovi navedeni antispastični i antinociceptivni učinci pripisuju se perifernim aktivnostima na razini neuromuskularne spojnice, odnosno senzornih živaca. Međutim, sve je više dokaza da BoNT/A ima i učinke na središnji živčani sustav (Caleo, i dr. 2018), (Matak, 2019.). Imunohistokemijski je dokazano da nakon injekcije u nazolabijalni mišić štakora postoje i nakupljanja SNAP-25 proteina u jezgri n.facialis. Također, specifično protutijelo na botulinum toksin tip A primijenjeno intraventrikularno i intracisternalno u cerebrospinalni likvor, sprječava pojavu pocijepanog SNAP-25 proteina u navedenoj jezgri. To je izravni dokaz da botulinum toksin zaista putuje u SŽS. Nadalje, dokazano je da ako se BoNT/A injicira u n.sciaticus ili m.gastrocnemius štakora da će se pocijepani protein SNAP-25 pronaći u ipsilateralnom ventralnom rogu kralježnične moždine (Matak 2020). Dakle, središnja aktivnost toksina u motornim regijama postoji, ali njegova uloga s obzirom na onu perifernu još nije precizno utvrđena.

3.4. Animalni model spastične paralize

U svrhu proučavanja učinaka BoNT/A osmišljen je štakorski model spastične paralize (Matak 2020). Postoje mnogi štakorski modeli spastičnosti, npr. spinalni ishemijski modeli. (Hefferan, Fuchigami i Marsala 2006). Jedan od nekadašnjih najčešćih načina izazivanja spastičnosti u štakorskim modelima bilo je izazivanje okluzije torakalne aorte što je rezultiralo spinalnom ishemijom i spastičnim neurološkim deficitima (Taira Y 1996). Da je riječ o sličnim mehanizmima nastajanja mišićnog hipertonusa u distoniji, tetanusu i spasticitetu potvrđuje terapijska učinkovitost uobičajeno korištenih lijekova (Hassel 2013). Stoga se lokalni povećani tonus mišića izazvan TeNT-om može upotrijebiti kao način umjetnog stvaranja povećane ekscitabilnosti motoneurona. Životinje se najprije anesteziraju i zatim im se i.m. apliciraju doze TeNT-a prethodno dogovorene (Matthews, Fishman i Wittenberg 2014). Štakori reagiraju brzim nastankom lokalne spastične paralize mišića uda u koji je dana injekcija (I. Matak, Evidence for central antispastic effect of botulinum toxin type A 2019). Tako nastao spasticitet odličan je model za ispitivanje može li BoNT/A reducirati simptome hiperkinetskih poremećaja.

4. HIPOTEZA

Nedavna istraživanja dokazala su da botulinum toksin A ima utjecaj na središnji živčani sustav. Pretpostavka koju smo htjeli dokazati je da centralni učinci BoNT/A pridonose smanjenju mišićnog tonusa u štakorskom modelu spasticiteta.

5. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Opći cilj rada je utvrđivanje postojanja utjecaja centralnih učinaka periferno primjenjenog BoNT/A na redukciju spastičnosti mišića.

Specifični ciljevi rada su:

1. Ocjenjivanje učinaka BoNT/A na spastičnu paralizu m.gastrocnemiusa uzrokovanu tetanus neurotoksinom pomoću bihevioralnih skala procjene.
2. Utvrđivanje doprinosa centralnih učinaka BoNT/A na dodatno smanjenje spasticiteta.
3. Ispitivanje dugoročnih učinaka BoNT/A na mišiće induciranjem spasticiteta ponavljanim intramuskularnim davanjem tetanus toksina.

6. MATERIJALI I METODE

6.1. Materijali- životinje

U istraživanju su korišteni štakori uzgojeni u prostoru za uzgajanje životinja pri Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Pokusi su provedeni u sklopu projekta Europskog socijalnog fonda i Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta (HR3.2.01-0178) za koji je izdana dopusnica Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te odobrenje Ministarstva poljoprivrede RH (EP 24-2/2015). Životinjama su rukovali članovi tima Laboratorija za molekularnu imunologiju osposobljeni za rad s pokusnim životinjama. Studija je provedena u suglasnosti s ARRIVE smjernicama za rukovanje sa životinjama i prema preporukama medicinskog časopisa *British Journal of Pharmacology* (Curtis, i dr. 2018). Štakori su soja Wistar starosti 3-4 mjeseca i mase 300-400g. Životinje su držane po tri u jednom kavezu uz slobodan pristup vodi i hrani.

6.2. Materijali- kemikalije

U radu koristili smo se tetanus toksinom, Botulinum toksinom i Botulinum antitoksinom. Sve navedene tvari pripravljene su po određenoj recepturi. Liofilizirani Tetanus toksin (Sigma Aldrich) rekonstituiran je u vehikulumu baziranom na fiziološkoj otopini koja sadrži 2% goveđeg serumskog albumina (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD). TeNT je serijski razrijeđen na koncentraciju od 0.5µg/ml. Alikvot je smrznut u tekućem dušiku i skladišten na -80°C do daljnje uporabe. Neposredno prije iniciranja TeNT, alikvoti su odmrznuti i dalje razrijeđeni vehikulumom da bi se dobila potrebna koncentracija. Liofilizirani komercijalni pripravak BoNT/A (Botox®, Allergan, Irvine, CA, USA) je rekonstituiran u fiziološkoj otopini, kako bi se dobilo potrebno razrjeđenje. Liofilizirani BoNT/A antitoksin temeljen na IgG protutijelima (Li, Matoo i Keller 2012) napravljen je u 0.9% fiziološkoj otopini u koncentraciji od 1,000 i.u./ml.

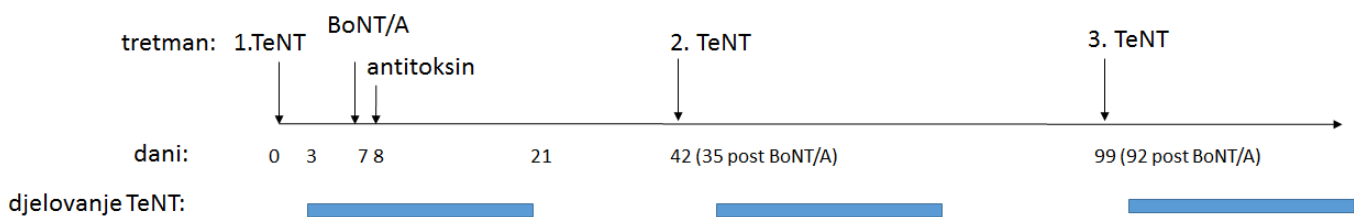
6.3. Farmakološki tretman

Štakori su najprije anestetizirani ketaminom ili ksilazinom intraperitonealno. Nakon toga štakorima je perkutano injicirano 20 mikrolitara TeNTpodijeljeno u dva mjesta injiciranja, odnosno 10 mikrolitara u lijevi trbuh i 10 mikrolitara toksina u desni trbuh desnog m.gastrocnemiusa. Na sličan način, 7 dana nakon primjene TeNT, injiciran je BoNT/A. Doze TeNT (1.5 ng) i BoNT/A (5 U/kg) su odabrane na temelju prethodno korištenim dozama (Cui 2004), (I. R. Matak 2012), (Matthews, Fishman i Wittenberg 2014). Doza lokalno primijenjenog BoNT/A od 5 U/kg (1 U označava mišju LD50 dozu, što sadrži 48 pg komercijalnog farmakološkog pripravka) daleko je ispod doze koja inducira sistemske učinke kod štakora (Cui 2004). Jedan dan nakon BoNT/A, duboko anestetizirane životinje (ketamin/ksilazin 70 mg/kg//7 mg/kg) su injicirane s BoNT/A-neutralizirajućim antitoksinom u dozi od 20 i.u. /20 µl u lumbalni intratekalni prostor. Antitoksin, koji središnje neutralizira transcitotski prijenos BoNT/A u sekundarne središnje sinapse, je korišten kao sredstvo kojim se blokiraju središnji učinci BoNT/A, u skladu s prijašnjim rezultatima (Caleo i sur. 2018).

6.4. Eksperimentalni protokol

Životinje su blok randomizacijom stavljene u različite pokusne skupine. Eksperimentator koji je provodio motoričke testove nije znao kako su životinje tretirane. Međutim, tijekom motoričke evaluacije određen izgled životinje uzrokovan specifičnim tretmanom nije mogao biti maskiran

(npr. rigidna ekstenzija zadnje nožice u TeNT tretiranih, bolja pokretljivost nožica u BoNT/A tretiranih itd.). Na kraju svih pokusa životinje su bile žrtvovane dubokom ketamin anestezijom praćenu transkardijalnom perfuzijom fiziološke otopine i 4% paraformaldehidnim fiksativom. Studiju smo dizajnirali kao dugotrajni pokus gdje smo promatrali periferne učinke BoNT/A istovremeno na dva različita tipa paralize: mlohavu paralizu koja se očituje sa privremeno smanjenim refleksom razdvajanja nožnih prstiju, te spastičnu paralizu, koju smo inducirali ponovljenim injekcijama TeNT. TeNT uzrokuje reverzibilni spazam mišića čije djelovanje počinje oko 3 dana nakon periferne primjene, a prestaje nakon tri tjedna. Drugu, ponovljenu injekciju TeNT se daje nakon što se kod štakora oporave parametri flacidne paralize, odnosno mogućnost razdvajanja nožnih prstiju, jer smo pretpostavili da bi se tada moglo bolje pratiti moguće centralne učinke BoNT/A. Treću injekciju TeNT smo dali u vremenskom periodu kada smo mogli pretpostaviti da bi korisni antispastički središnji učinci BoNT/A mogli oslabiti, u skladu s iskustvom u terapijskoj primjeni.



Životinje su dobile intratekalno injiciran BoNT/A- antitoksin (antiserum) 20-24h nakon administracije im. BoNT/A. Motorički parametri su mjereni 0. (prije TeNT), 1.,3.,7.(prije fiziološke/BoNT/A), 8. (prije administracije antitoksina),10., 12., 14. dan nakon TeNT aplikacije. Životinje su bile raspoređene u 3 eksperimentalne skupine: 5 životinja u kontrolnoj spastičnoj skupini koje su dobile su samo TeNT, fiziološku otopinu i konjski serum, te po 6 životinja u svakoj eksperimentalnoj spastičkoj grupi koje su primile BoNT/A (TeNT + BoNT/A + konjski serum, TeNT + BoNT/A + antitoksin).

6.5. Bihevioralni testovi motorike

Bihevioralni testovi motorike korišteni su u obje skupine životinja kako bi evaluirali učinke neurotoksina. Zahvaljujući ovim testovima moći ćemo vidjeti ima li razlike u motorici štakora koji su nakon TeNT injekcije primili BoNT/A i onih koji BoNT/A nisu primili. Nadalje,

evaluirat ćemo motoričko ponašanje i onih životinja koje su primile i.t. BoNT/A antitoksin nakon i.m. BoNT i onih koje to nisu primile.

6.5.1. Otpor na pasivnu fleksiju gležnja

Prije nego što evaluiramo učinke BoNT/A na opuštanje mišića, moramo izmjeriti učinak TeNT-a na postizanje ukočenosti mišića. Da bi se procijenila ta veličina spasticiteta, odnosno lokalne rigidnosti mišića najprije se koristio pokus otpora na pasivnu fleksiju gležnja. Životinje su najprije pažljivo podignute na plastičnu platformu koja se nalazi na digitalnoj vagi. Zatim se napravi dorzifleksija gležnja, točnije tibiotarzalnog zgloba od 90 stupnjeva. Te s digitalnog prikaza očitamo težinu u gramima koja je postignuta pritiskom šape. Prije pokusa i u kontrolnih životinja koje nisu tretirane s TeNT stražnja šapa je bila opuštena, a sila otpora na dorzifleksiju stalno malena (oko 10-20 g). Nasuprot tome, TeNT-tretirane životinje pokazale su veliki otpor.

6.5.2. DAS- refleks širenja nožnih prstiju

Takozvani DAS test (kratica od eng. *digit abduction score*, skala kojom se ocjenjuje abdukcija nožnih prstiju) se temelji na refleksu širenja nožnih prstiju, odnosno kada štakorovu šapu podignemo s tvrdog oslonca ono širi svoje nožne prste. Kao što je već opisano (Broide i sur. 2013), DAS skala se koristi u miševa i štakora kako bi ocijenili učinke BoNT/A na lokalnu mišićnu aktivnost. Međutim, kada štakoru injiciramo tvar (t.j. TeNT) koja uzrokuje rigidnost mišića koji je zadužen za navedeni refleks, onda štakor otežano širi prste ili ih uopće ne širi. Navedenu pojavu bilježimo kao digitalni abdukcijski skor. Rezultat bilježimo brojevima od 0 do 4. Rezultat 0 znači razdvajanje svih prstiju, a rezultat 4 da su svi prsti skupljeni. Naravno, mogući su i rezultati između.

6.5.3. Basso Beattie Bresnhan skala

Basso Beattie Bresnhan skala (BBB skala) služi pri ocjenjivanju lokomotorne sposobnosti štakora nakon oštećenja u području centralnog živčanog sustava. Oporavak motorike štakora se kreće u standardnim uzorcima ponašanja te je svakom uzorku dodijeljen određen broj od 0 (kada ispitivač ne uočava ikakav pokret zadnje šape, odnosno oštećenje SŽS-a je maksimalno) do 21 (štakor se normalno kreće, nema nikakvog oštećenja SŽS-a). Skala se smatra izuzetno pouzdanom u evaluaciji motorike štakora pri blagim oštećenjima (Filho i Molina 2008) te ju zato smatramo odličnim evaluatorom u našoj studiji.

U evaluaciji štakora pomoću BBB skale korištena je videoanaliza. Ponašanje štakora bilo je snimano te kasnije ocijenjeno od 0 do 21 prema vrijednostima iz tablice 1. Dva promatratelja su, ne znajući kako su štakori tretirani i kojoj eksperimentnoj skupini štakora pripadaju, morali ocijeniti njihovu motoriku. Studija je dakle provedena slijepo i randomizirano. BBB skalom evaluirane su tri skupine štakora. Prva skupina je ona koja je dobila TeNT, fiziološku otopinu i

konjski serum. Druga je ona koja je dobila TeNT, BoNT/A i konjski serum, a treća je ona s dobivenim TeNT, BoNT/A i antitoksinom.

TABLICA 1. BBB skala prevedena na hrvatski jezik

| | |
|---|-----------|
| Nema nikakvog pokreta zadnje nožice | 0 |
| Slabi pokret jednog ili dva zgloba, obično koljena i/ili kuka | 1 |
| Značajan pokret jednog zgloba ili značajan pokret jednog zgloba i lagani pokret drugog | 2 |
| Značajan pokret dva zgloba | 3 |
| Slabi pokret sva tri zgloba zadnje nožice | 4 |
| Slabi pokret dva zgloba i značajan pokret jednog zgloba | 5 |
| Značajan pokret dva zgloba i slabi pokret jednog | 6 |
| Značajan pokret sva tri zgloba | 7 |
| Zamahivanje nožicom bez održanja vlastite težine ili stavljanje šape s plantarne strane bez držanja težine | 8 |
| Postavljanje šape s plantarne strane uz održavanje težine ali samo u mirnom stavu ili povremeno, učestalo ili stalno održanje težine hodanjem s dorzalne strane šape bez hodanja s plantarne strane | 9 |
| Povremeno hodanje šapom s plantarne strane, ali bez kordinacije prednjih i stražnjih nožica | 10 |
| Učestalo do stalno hodanje s plantarne strane, bez koordinacije prednje i stražnje nožice | 11 |
| Učestalo do stalno hodanje s plantarne strane s povremenom koordinacijom prednje i stražnje nožice | 12 |

| | |
|--|-----------|
| Učestalo do stalno hodanje s plantarne strane s učestalom koordinacijom prednje i stražnje nožice | 13 |
| Stalni plantarni koraci s održanjem težine, stalna koordinacija prednjih i stražnjih nožica i dominantan rotiran položaj šaipce prema unutra ili van kada se štakor dočeka na podlogu ili van kada se štakor dočeka na podlogu ili netom nakon što ga se odigne od podloge, ili učestalo plantarno hodanje, konstantna koordinacija prednjih i stražnjih nožica i povremeno hodanje dorzalnom stranom šapice | 14 |
| Konstantno hodanje plantarnom stranom i konstantna koordinacija prednjih i stražnjih nožica, bez odmicanja palca ili povremeno odmicanje palca tijekom kretnje prednjim nožicama i dominantna pozicija šapice je paralelna s tijelom pri inicijalnom kontaktu | 15 |
| Konstantno hodanje plantarnom stranom i konstantna koordinacija prednjih i stražnjih nožica, učestalo odmicanja palca tijekom kretnje prednjim nožicama i dominantna pozicija šape paralelna s tijelom pri inicijalnom kontaktu ili rotirana nakon odizanja štakora | 16 |
| Konstantno hodanje plantarnom stranom i konstantna koordinacija prednjih i stražnjih nožica, učestalo odmicanja palca tijekom kretnje prednjim nožicama i dominantna pozicija šape paralelna s tijelom pri inicijalnom kontaktu i paralelna nakon odizanja štakora | 17 |

| | |
|--|-----------|
| Konstantno hodanje plantarnom stranom i konstantna koordinacija prednjih i stražnjih nožica, konstantno odmicanja palca tijekom kretnje prednjim nožicama i dominantna pozicija šape paralelna s tijelom pri inicijalnom kontaktu i rotirana nakon odizanja štakora | 18 |
| Konstantno hodanje plantarnom stranom i konstantna koordinacija prednjih i stražnjih nožica, konstantno odmicanja palca tijekom kretnje prednjim nožicama i dominantna pozicija šape paralelna s tijelom pri inicijalnom kontaktu i paralelna nakon odizanja štakora, rep je dolje većinu ili cijelo vrijeme | 19 |
| Konstantno hodanje plantarnom stranom, konstantna koordinacija nožica, konstantno odmicanje palca tijekom kretnje prednjim nožicama i dominantna pozicija šape paralelna s tijelom pri inicijalnom kontaktu i nakon podizanja štakora, rep je konstatno podignut, ali prisutna nestabilnost tijela | 20 |
| Konstantno hodanje plantarnom stranom, konstantna koordinacija nožica, konstantno odmicanje palca tijekom kretnje prednjim nožicama i dominantna pozicija šape paralelna s tijelom pri inicijalnom kontaktu i nakon podizanja štakora, rep je konstatno podignut, stabilnost tijela | 21 |

6.6. Statistička analiza

Podaci i statistička analiza napravljene su prema preporukama časopisa *British Journal of Pharmacology* iz dijela o eksperimentalnom dizajnu i analizi u farmakologiji (Curtis, i dr. 2018). Bihevioralni motorički rezultati prikazani su kao aritmetička sredina \pm standardna

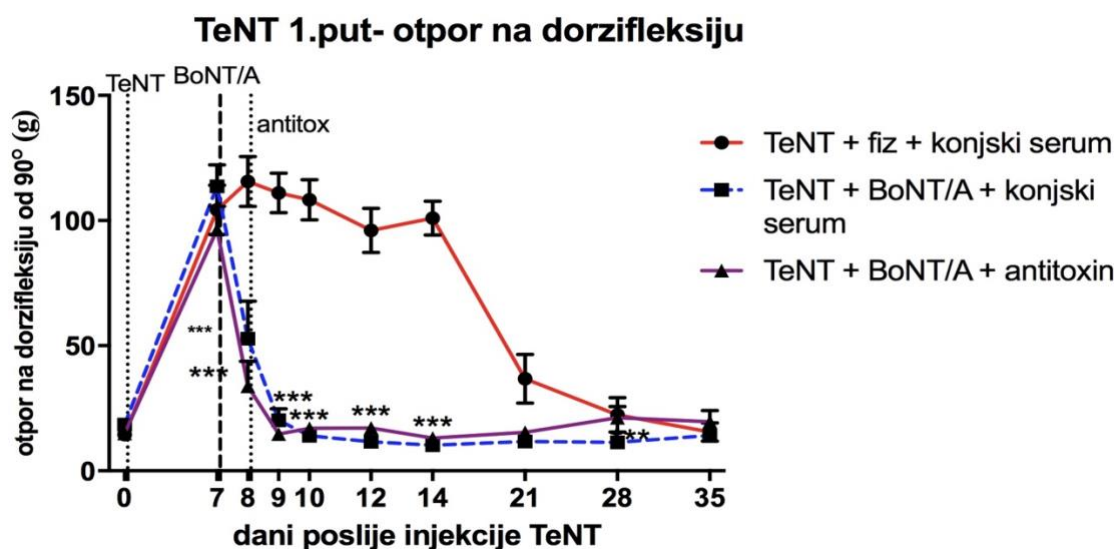
srednja greška i analizirani dvosmjernom analizom varijance za ponovljena mjerenja, nakon koje je slijedio Bonferonijev post hoc test. Podaci iz DAS testa prezentirani su kao medijani i analizirani prema Kruskal–Wallison-parametrijski jednosmjerni test ANOVA, praćen Dunnovim mulltiplim post hoc testom ($P < .05$ smatra se značajnim). Svi podaci su analizirani u GraphPad programu. Broj životinja u grupi određen je na pet ili šest na temelju procijenjene veličine utjecaja od $F = 0.4$, α pogreška vjerojatnosti = .05, $(1-\beta) = 0.9$.

7. REZULTATI

7.1. Primarna indukcija spasticiteta TENT-om i učinak BoNT/A na animalni model spastične paralize

Sve eksperimentalne grupe štakora su primile injekciju TeNT u m. gastrocnemius stražnjeg uda te je time izazvana je spastična pareza. Shodno tome, u svim eksperimentalnim grupama dolazi do postupnog povećanja otpora na dorzifleksiju, koji svoji vrhunac doseže sedmog, odnosno osmog dana od aplikacije TeNT.

Dvije eksperimentalne skupine su sedmog dana nakon TeNT primile injekciju BoNT/A, a treća skupina je osmog dana nakon injekcije primila i antitoksin intratekalno (kako bi se u toj skupini onemogućili centralni učinci botulinum toksina). Kao što je vidljivo na slici 1.a, kod svih

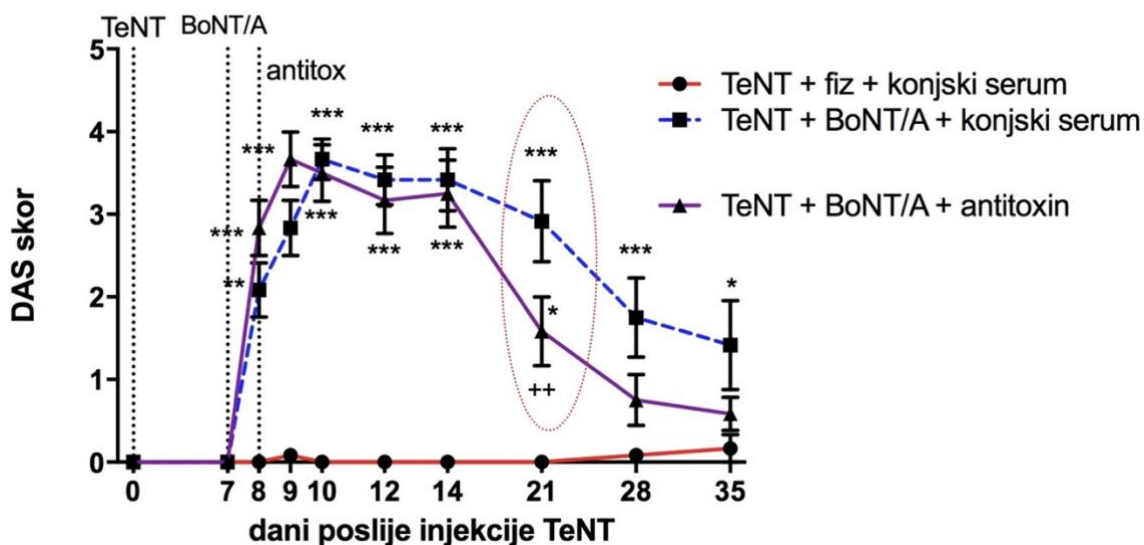


Slika 1.a Mišićna hipertoniya izazvana i.m.TeNT (1.5 ng) u eksperimentu se očituje kao porast otpora na dorzifleksiju. Daljnjom primjenom i.m.BoNT/A (5 U/kg) otpor na dorzifleksiju pada te se vraća na početnu razinu prije indukcije spasticiteta. Legenda: fiz: tretman fiziološkom otopinom; antitoxin: antitoksin; Duge iscrtkane linije označavaju vremena primjene TeNT, BoNT/A i antitoksina, a oznake na apscisi označavaju dan nakon primjene TeNT. Aritmetička sredina ± srednja standardna greška; ***- $p < 0.001$ u usporedbi s kontrolnom grupom (TeNT + fiz + konjski serum). Učinjena je dvosmjerna ANOVA za ponovljena mjerenja i Bonferronijev post hoc test).

skupina postoji porast otpora na dorzifleksiju stražnjeg uda, kao posljedica razvijenog spasticiteta. Međutim, kod skupina koje su primile BoNT/A, zbog njegovog učinka sniženja mišićne hipertoniye, već prvog dana nakon injekcije dolazi do značajnog smanjenja otpora na dorzifleksiju. U daljnjim mjerenjima nije došlo do porasta otpora. Između skupine u kojoj postoje centralni učinci toksina i zadnje skupine u kojoj su oni poništeni djelovanjem antitoksina, ne postoje značajne razlike.

Nadalje, životinje koje su primile BoNT/A prikazuju znatno veći DAS zbroj bodova nego skupina tretirana bez botulinum toksina (slika 1.b). Pritom se primjećuje vidljiva razlika između životinja koje su intratekalno primile antitoksin (čime je sprječeno djelovanje botulinum toksina na centralni živčani sustav) i one koje nisu. Najveća razlika prisutna je u razdoblju od 14. do 21. dana poslije indukcije spasticiteta TENT-om (na slici 1.b označena iscrtanim krugom).

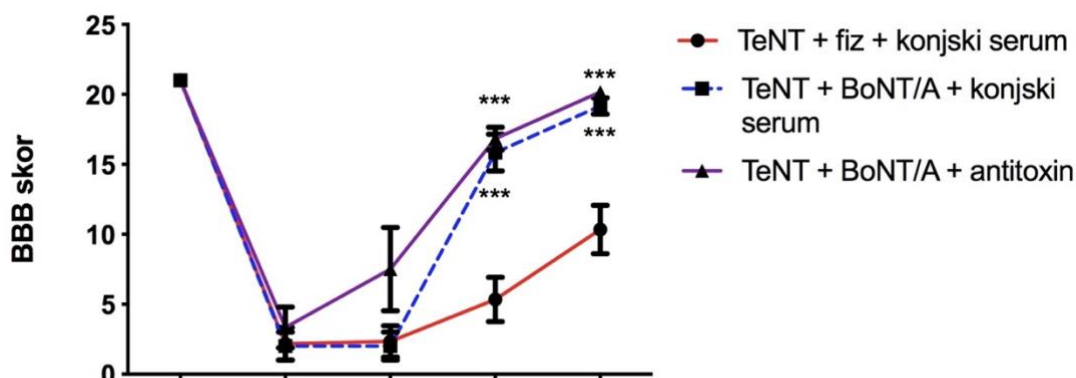
TeNT 1.put- DAS



Slika 1.b DAS skor se povećava u skupinama koje su primile i.m. BoNT/A (5U/kg) nakon mišićne hipertonijske uzrokovane TeNT (1.5 ng) i.m.. Legenda: fiz: tretman fiziološkom otopinom; antitoxin: antitoksin; Duge iscrtkane linije označavaju vremena primjene TeNT, BoNT/A i antitoksina, a oznake na apscisi označavaju dan nakon primjene TeNT. Aritmetička sredina ± srednja standardna greška; ***- $p < 0.001$ u usporedbi s grupom TeNT + fiz + konjski serum; + $p < 0.05$; +++- $p < 0.001$ u usporedbi s grupom TeNT + BoNT/A + konjski serum. Učinjena je dvosmjerna ANOVA za ponovljena mjerenja i Bonferronijev post hoc test.

Na ispitivanju motorike i ocjenjivanju životinja pomoću BBB skale, životinje koje su primile BoNT/A su bolje motoričke sposobnosti nego one koje to nisu. Ponovno postoji razlika između grupe koja je primila antitoksin, i ona koja to nije. U ovom slučaju, razlika je najvidljivija od osmog do 14. dana poslije indukcije spasticiteta (slika 1.c).

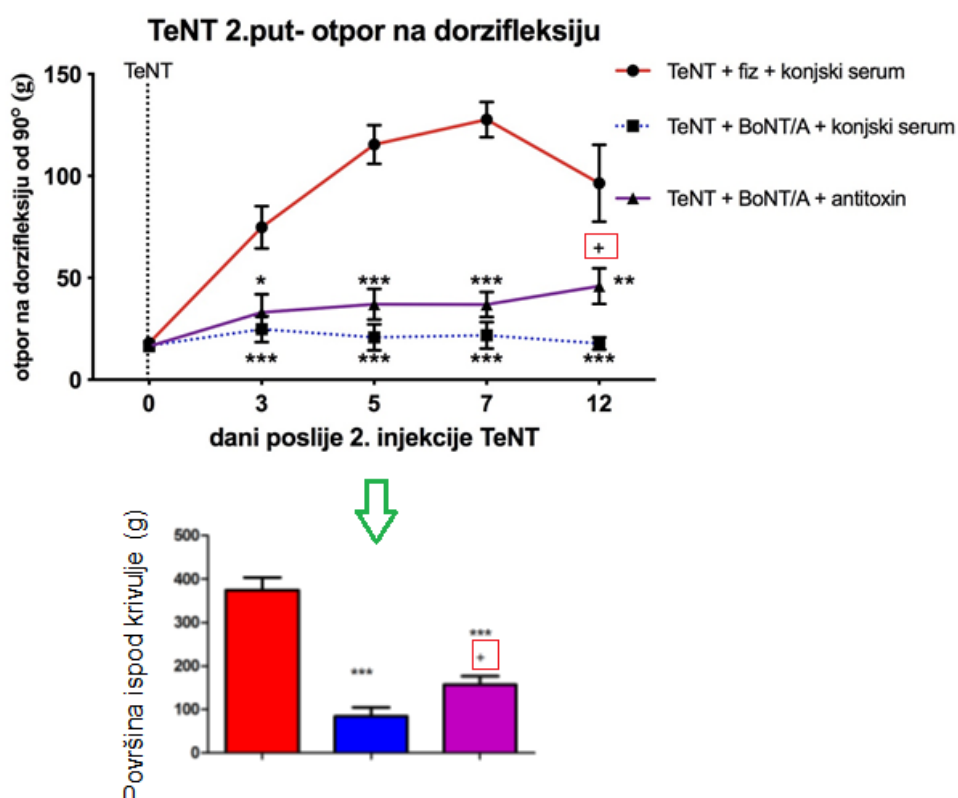
TeNT 1. put- BBB



Slika 1.c Životinje koje su nakon spasticiteta uzrokovanog TeNT (1.5 ng) i.m. primile BoNT/A (5U/kg) i.m. ostvaruju veći broj bodova prilikom ocjenjivanja motorike koristeći BBB skalu. Legenda: fiz: tretman fiziološkom otopinom; antitoxin: antitoksin; Duge iscrtkane linije označavaju vremena primjene TeNT, BoNT/A i antitoksina, a oznake na apscisi označavaju dan nakon primjene TeNT. Aritmetička sredina ± srednja standardna greška; ***- $p < 0.001$ u usporedbi s grupom TeNT + fiziološka + konjski serum; (dvosmjerna ANOVA za ponovljena mjerenja i Bonferronijev post hoc test).

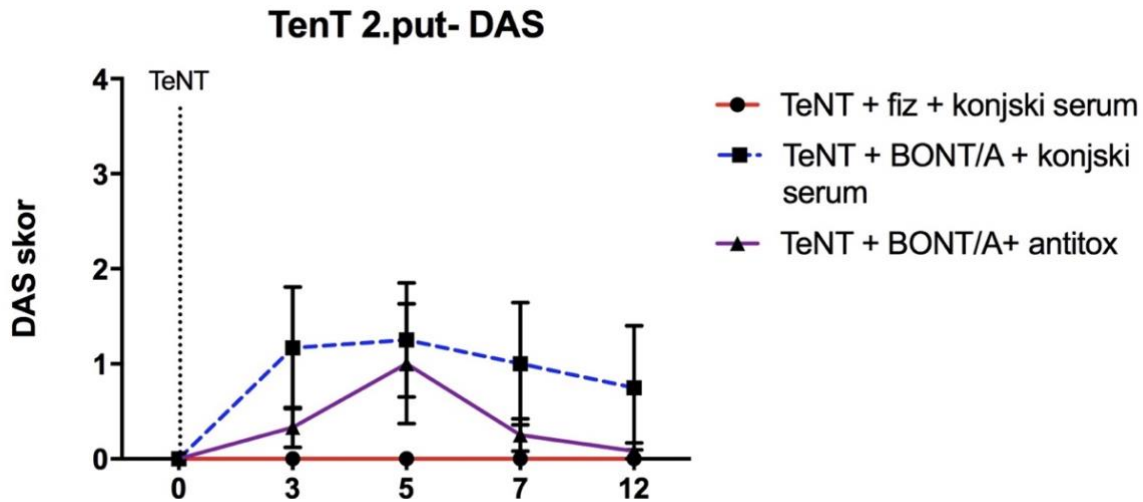
7.2. Sekundarna indukcija spasticiteta TeNT-om

Nakon druge indukcije mišićne hipertonijske tetanus toksinom, skupina koja nije primila BoNT/A imala je veći otpor na dorzifleksiju od 90 stupnjeva (slika 2.a). Skupina u kojoj su centralni učinci botulinum toksina bili prisutni i u ovom eksperimentu pokazuje manji otpor prema dorzifleksiji.



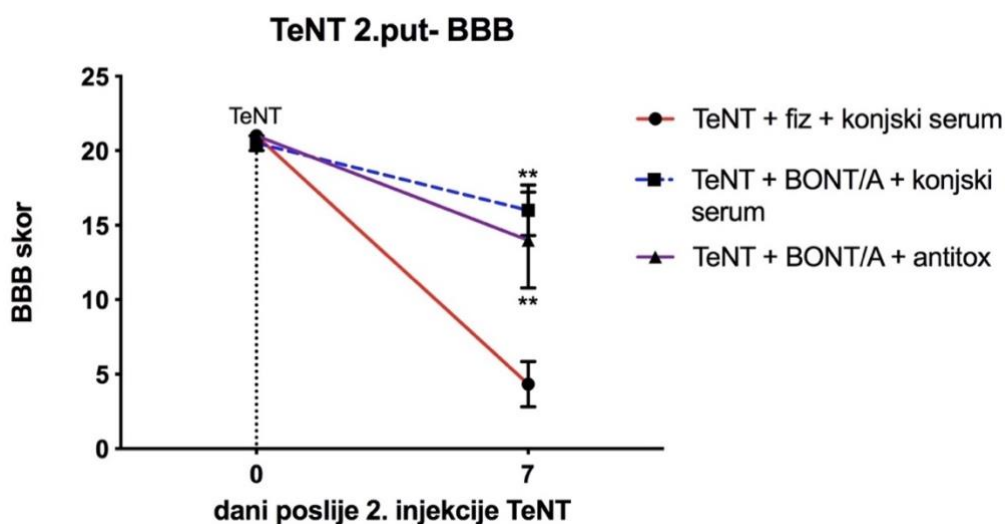
Slika 2.a Nakon druge indukcije spasticiteta TeNT-om (1.5 ng), životinje koje su primile BoNT/A (5U/kg) pokazuju manji otpor prema dorzifleksiji stražnjeg uda. Najmanji otpor pokazuje skupina koja nije primila antitoksin. Legenda: fiz: tretman fiziološkom otopinom; antitoxin: antitoksin; Duge iscrtkane linije označavaju vremena primjene TeNT, a oznake na apscisi označavaju dan nakon primjene TeNT. Aritmetička sredina ± srednja standardna greška; ***- $p < 0.001$ u usporedbi s grupom TeNT + fiz + konjski serum; + $p < 0.05$; +++- $p < 0.001$ u usporedbi s grupom TeNT + BoNT/A + fiz. (dvosmjerna ANOVA za ponovljena mjerenja i Bonferronijev post hoc test). Za statističku analizu površina ispod krivulja smo koristili jednosmjernu ANOVU i Bonferronijev post hoc test.

Slično otporu na dorzifleksiju, najbolje rezultate prilikom mjerenja refleksa nožnih prstiju, pokazuje skupina štakora koja uz BoNT/A, nije primila antitoksin (slika 2.b).



Slika 2.b Skupina životinja koja uz botulinum toksin nije primila antitoksin pokazuje najbolje rezultate prilikom mjerenja DAS skora. Legenda: fiz: tretman fiziološkom otopinom; antitoksin: antitoksin; Duge iscrtkane linije označavaju vremena primjene TeNT, a oznake na apscisi označavaju dan nakon primjene TeNT. Aritmetička sredina ± srednja standardna greška;

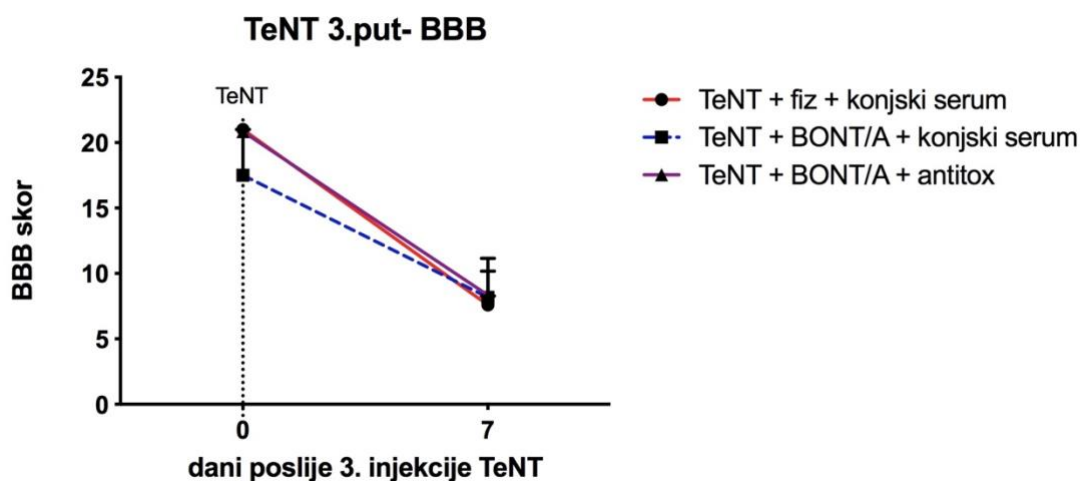
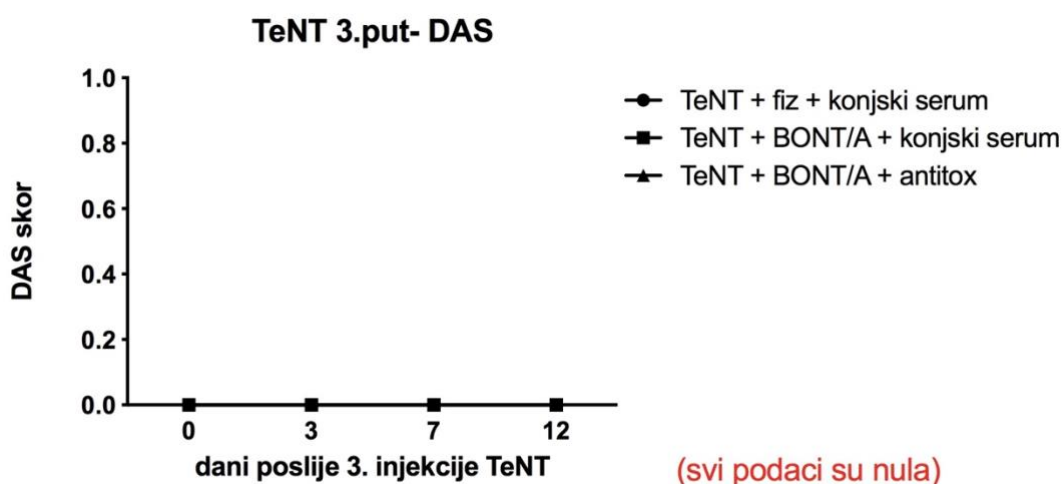
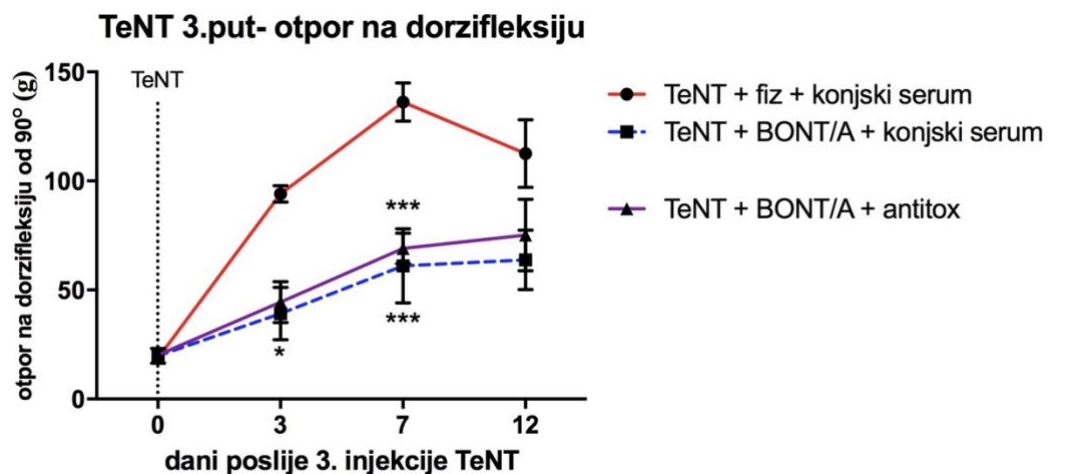
Također, nakon druge indukcije mišićne hipertonije tetanus toksinom te nakon primljenog BoNT/A, najmanji pad motoričkih sposobnosti mjerenih prema BBB skali (slika 2.c) pokazuje skupina bez primljenog antitoksina, a najgori skupina koja je uz TeNT primila samo fiziološku otopinu i konjski serum.



Slika 2.c Životinje koje su nakon spasticiteta uzrokovanog TeNT (1.5ng)i.m. primile BoNT/A (5U/kg) i.m., ali ne i antitoksin, ostvaruju veći broj bodova na BBB skali nego ostale tretirane životinje. Legenda: fiz: tretman fiziološkom otopinom; antitoksin: antitoksin; Duge iscrtkane linije označavaju vremena primjene TeNT, a oznake na apscisi označavaju dan nakon primjene TeNT. Aritmetička sredina ± srednja standardna greška; ***- $p < 0.001$ u usporedbi s grupom TeNT + fiz + konjski serum; + $p < 0.05$; +++ $p < 0.001$ u usporedbi s grupom TeNT + BoNT+A + fiz. (dvosmjerna ANOVA za ponovljena mjerenja i Bonferronijev post hoc test).

7.3. Tercijarna indukcija spasticiteta TENT-om

Nakon treće injekcije TENTom, životinje koje su primile injekciju BONT/A su imale manji otpor prema dorzifleksiji. Ostali bihevioralni testovi motorike nisu pokazivali razliku među eksperimentalnim skupinama (slika 3). Štoviše, štakori koji su primali BoNT/A su imali manju magnitudu spasticiteta, uzrokovanu vidljivom dugotrajnom mišićnom atrofijom koja je potvrđena mjerenjem dijametra m.gastrocnemiusa 92 dana poslije tretmana BoNT/A (slika 4, slika 5, tablica 2).



Slika 3. Razlika između eksperimentalnih skupina primjećuje se samo prilikom metode mjerenja otpora na dorzifleksiju, gdje ponovno skupina bez injiciranog BoNT/A (5U/kg) i.m. pokazuje najveći otpor. Konačni rezultati tijekom ispitivanja DAS skora i BBB skora su isti za sve tretirane životinje. Legenda: fiz: tretman fiziološkom otopinom; antitoxin: antitoksin; Duge iscrtkane linije označavaju vremena primjene TeNT,a oznake na apscisi označavaju dan nakon primjene TeNT. Aritmetička sredina ± srednja standardna greška; ***- $p < 0.001$; *- $p < 0.05$ u usporedbi s grupom TeNT + fiz + konjski serum; (dvosmjerna ANOVA za ponovljena mjerenja i Bonferronijev post hoc test).



Slika 4. Prikaz lijevog, netretiranog m.gastrocnemiusa 92 dana poslije aplikacije BoNT/A



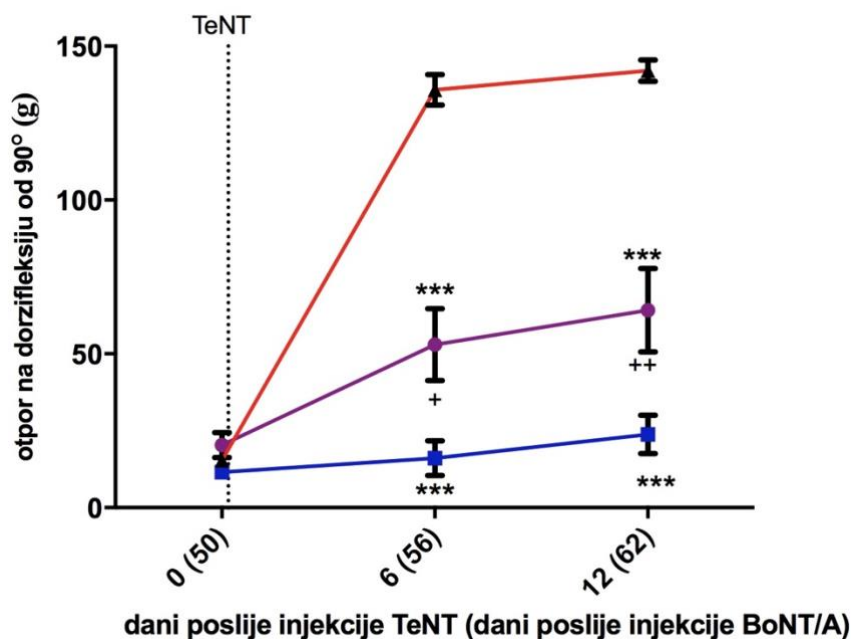
Slika 5. Prikaz desnog, tretiranog m.gastrocnemiusa 92 dana poslije aplikacije BoNT/A u vidljivoj atrofiji

TABLICA 2.

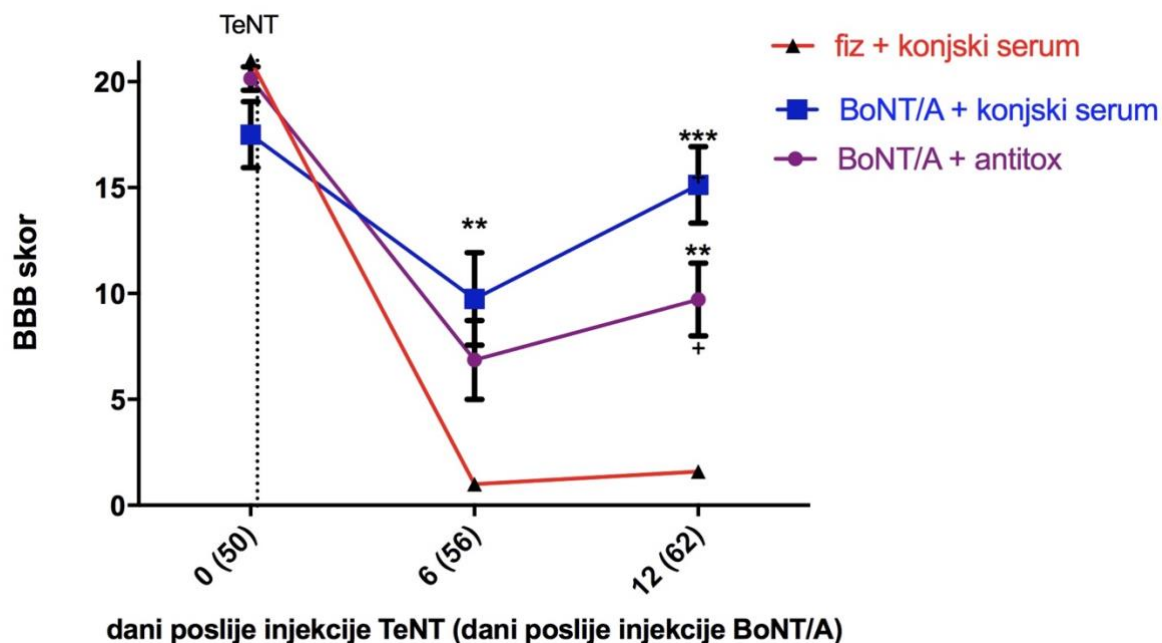
| TRETMAN | dijametar lijevog (netretiranog) m. gastrocnemiusa | dijametar desnog (tretiranog) m. gastrocnemiusa |
|-------------------------------|--|--|
| TeNT + fiz + konjski serum | 19.6 ± 0.15 | 18.8 ± 0.36 |
| TeNT + BoNT/A + konjski serum | 18.8 ± 0.18 | 14.0 ± 0.57 |
| TeNT + BoNT/A + antitoksin | 19.2 ± 0.30 | 14.5 ± 0.39 |

7.4. Potvrdni eksperiment

U odvojenom pokusu cilj nam je bio potvrditi prethodno zabilježene centralne učinke, ali bez ponavljanih indukcija spasticiteta TeNT-om. Eksperimentalne grupe su ostale iste. U ovom slučaju i.m. aplikacija BoNT/A nastupila je prije i.m. aplikacije TeNT. Od bihevioralnih testova motorike učinjeni su mjerenje otpora na dorzifleksiju gležnja i ocjena motorike prema BBB skali. Nakon injekcije TeNT, mjerenja su obavljena 50, 56 i 62 dana nakon injekcije BoNT. Pomoću oba parametra zabilježene su znatne razlike između kontrolne grupe i ostalih grupa koje su primile BoNT/A te između grupe koja je primila BoNT/A i antitoksin te grupe koja je primila BoNT/A, ali ne i antitoksin (slika 6 i 7).



Slika 6. U potvrdnom eksperimentu analizirane su životinje kod kojih je i.m. injekcija TeNT (1.5 ng) nastupila 50 dana nakon i.m. injekcije BoNT/A (5U/kg). Znatne razlike vidljive su između svih eksperimentalnih grupa. Legenda: fiz: tretman fiziološkom otopinom; antitoxin: antitoksin; Duge iscrtkane linije označavaju vremena primjene TeNT, a oznake na apscisi označavaju dan nakon primjene TeNT. Aritmetička sredina ± srednja standardna greška; ***- $p < 0.001$ u usporedbi s grupom TeNT + fiz + konjski serum; + $p < 0.05$; +++- $p < 0.001$ u usporedbi s grupom TeNT + BoNT/A + fiz. (dvosmjerna ANOVA za ponovljena mjerenja i Bonferronijev post hoc test).



Slika 7. U potvrdnom eksperimentu analizirane su životinje kod kojih je i.m. injekcija TeNT (1.5 ng) nastupila 50 dana nakon i.m. injekcije BoNT/A (5U/kg). Mjerenja su vršena 50, 56 i 62 dana nakon TeNT aplikacije. Znatne razlike vidljive su između svih eksperimentalnih grupa. Legenda: fiz: tretman fiziološkom otopinom; antitoxin: antitoksin; Duge iscrtkane linije označavaju vremena primjene TeNT, a oznake na apscisi označavaju dan nakon primjene TeNT. Aritmetička sredina ± srednja standardna greška; ***- $p < 0.001$ u usporedbi s grupom TeNT + fiz + konjski serum; + $p < 0.05$; +++- $p < 0.001$ u usporedbi s grupom TeNT + BoNT/A + fiz. (dvosmjerna ANOVA za ponovljena mjerenja i Bonferronijev post hoc test).

8. RASPRAVA

U ovoj studiji promatrali smo učinak BoNT/A na pojačani tonus mišića izazvan intramuskularnom aplikacijom TeNT u mišić gastrocnemius štakora. Nakon razvijene lokalne spastične paralize, štakori su podijeljeni u eksperimentalne grupe s različitim tretmanima; kontrolna grupa koja nije primila BoNT/A, grupa koja ga je primila 7. dana poslije injekcije TeNT te zadnja grupa koja je uz primljeni BoNT/A (također 7 dana poslije TeNT) primila i antitoksin dan poslije. Na svim eksperimentalnim životinjama su provedeni bihevioralni testovi motorike. Njima smo ocijenili otpor štakora na dorzifleksiju, DAS i BBB skor. Nakon prve indukcije lokalnog spasticiteta TeNT-om, nastupile su druga i treća. Time smo htjeli promatrati dugotrajnost učinka BoNT/A na hipertonus mišića.

Kao što je vidljivo iz naših rezultata, skupina štakora koja je primila BoNT/A, ali ne i antitoksin, pokazala je najbolju očuvanu motoriku prema korištenim bihevioralnim testovima (slika 1a, 1b i 1c). Tijekom perioda flacidne paralize (do 14 dana poslije indukcije botulinum toksina), centralni učinci toksina nisu utjecali na antispastičku aktivnost botulinum toksina (što se vidi nedostatkom razlike u procjeni motorike štakora u grupi koja je uz botulinum primila antitoksin i ona koja to nije).

Ipak, sekundarnom indukcijom spastičke paralize injekcijom TeNTa (35 dana poslije injekcije BoNT/A), štakori koji su primili botulinum antitoksin su imali manju redukciju spasticiteta uda (slike 2a, 2b i 2c). Nakon treće injekcije TeNT-om, životinje koje su primile injekciju BoNT/A su imale manju magnitudu spasticiteta, uzrokovanu vidljivom dugotrajnom mišićnom atrofijom, koja je potvrđena mjerenjem promjera netretiranog i tretiranog mišića gastrocnemiusa štakora (tablica 2, slike 4 i 5).

Potvrdnim eksperimentom utvrđeno je da se centralni učinci BoNT/A bolje vide oko 50 do 60 dana nakon BoNT/A, što smo dokazali izraženim razlikama u otporu na dorzifleksiju i ocjeni prema BBB lokomotornoj skali između eksperimentalnih grupa (slike 6 i 7).

Periferni učinci botulinum toksina su dobro poznati- cijepanjem proteina sinapse SNAP-25 onemogućuje prijenos neurotransmitera acetilkolina na neuromuskularnoj spojnici i time uzrokuje mlohavu paralizu mišića. Međutim, striktno perifernim učinkom ne možemo objasniti sve kliničke posljedice ovog toksina (Rosales i Dressler 2010), pa tako ni posljedice u ovom istraživanju. Učinak botulinum toksina u centralnom živčanom sustavu zabilježen je i prijašnjim eksperimentima (Trompetto i sur. 2006; Mazzocchio i Caleo 2015). Ovim radom

on je potvrđen te je opserviran kroz dulji period. Ponovnim indukcijama spasticiteta centralni učinci redukcije hipertonije mišića su postali vidljivi nakon prestanka perifernih učinaka toksina, dok je mišićna atrofija nastupila nakon utjecaja centralnih učinaka toksina i nadvladala njihovo trajanje.

Postojanje BoNT/A u centralnom živčanom sustavu dokazano je i prijašnjim studijama, gdje je pocijepani SNAP-25 dokazan imunohistokemijski u jezgri n. facialis nakon intramuskularne injekcije u nazolabijalni mišić miša i štakora. Pritom BoNT/A pokazuje retrogradni način transporta od početnog ulaznog mjesta, odnosno mišića, sve do motoneurona n. facialis te selektivnost prema kolinergičnim kanalima. Time se naslućuje sposobnost BoNT/A da djeluje selektivno i modulira ponašanje određenih živčanih puteva (Caleo i sur, 2018).

Jedna od teškoća današnje znanosti jest svakako translacija istraživanja učinjenih na kulturi stanica i životinjskim modelima u valjane terapijske mogućnosti koje će biti uspješne u kliničkoj praksi. Tome svjedoči pad u uspješnosti prolaska druge faze kliničkih ispitivanja prilikom razvoja farmakološkog pripravka (Arrowsmith 2011). Stoga je potrebno oprezno odabrati subjekt istraživanja i napraviti potvrđne studije učinkovitosti lijeka (Prinz, 2011). Ovaj eksperiment, koristeći makroskopske metode mjerenja motoričkih sposobnosti tretiranih životinja, utvrđuje već prethodno potvrđena istraživanja o postojanju centralnih učinaka BoNT/A koji pomažu pri redukciji spasticiteta. Štoviše, eksperimentom potvrđujemo djelovanje centralnih učinaka BoNT/A na smanjenje mišićne hipertonije nakon što su popustili dobro poznati periferni učinci.

Utjecaj spasticiteta na pacijente, ali i njihove negovatelje je znatan. Spazam mišića poslije moždanog udara negativno utječe na bolesnikovu sposobnost obavljanja svakodnevnih aktivnosti i snižava kvalitetu života (Welmer i sur. 2006). Također, farmakološki tretmani i rehabilitacija, koji čine glavne metode liječenja spasticiteta, predstavljaju značajan teret za zdravstveni sustav (Lundström i sur. 2010). Stoga smatramo da je važno što detaljnije znanstveno istražiti svaku terapijsku mogućnost i tako pridonijeti uspješnijem liječenju ovih teških poremećaja.

9. ZAKLJUČCI

U ovom istraživanju ispitivali smo djelovanje BoNT/A na štakorski model lokalne spastične paralize izazvane TeNT-om. Promatranjem razlike između perifernih i centralnih učinaka BoNT/A tijekom tri indukcije spasticiteta, možemo potvrditi hipotezu da centralni učinci pridonose smanjenju povećanog mišićnog tonusa u štakorskom modelu spasticiteta.

Ukupni učinci BoNT/A na abnormalni mišićni tonus uključuju:

1. perifernu mlohavu paralizu, koja je trajala 3-4 tjedna nakon injekcije toksina. Tijekom tog perioda, centralni učinci na redukciju mišićnog spazma nisu zabilježeni.
2. centralne učinke na redukciju spasticiteta; prestankom mlohave paralize i ponovnom, odnosno sekundarnom indukcijom spasticiteta primjećena je razlika između životinja kod kojih je pretpostavljeni centralni učinak toksina bio omogućen, i onih kod kojih nije bio omogućen (djelovanjem antitoksina).
3. mišićnu atrofiju; naposljetku je razvijena mišićna atrofija nadvladala trajanje perifernih i centralnih učinaka toksina.

10. ZAHVALE

Zahvaljujem mentoru, dr.sc. Ivici Mataku što mi je pružio priliku upoznati se s mnogim laboratorijskim i stručnim dijelovima znanosti. Posebno mu zahvaljujem na iznimnom strpljenju i razumijevanju, što mu nikad neću zaboraviti.

11. POPIS LITERATURE

- Alexander, G E, and M D Crutcher. 1990. "Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing." *Trends in neurosciences* 7.
- Arrowsmith, John. 2011. "Trial Watch: Phase II Failures: 2008-2010." *Nature Reviews Drug Discovery* 10 (5): 328–29. <https://doi.org/10.1038/nrd3439>.
- Batla, Amit. 2018. "Dystonia: A review." *Neurology India* 11.
- Brinar, Vesna. 2009. *Neurologija za medicinare*. Zagreb: Medicinska naklada.
- Broide, Ron S., John Rubino, Gregory S. Nicholson, Maria C. Ardila, Meenakshi S. Brown, K. Roger Aoki, and Joseph Francis. 2013. "The Rat Digit Abduction Score (DAS) Assay: A Physiological Model for Assessing Botulinum Neurotoxin-Induced Skeletal Muscle Paralysis." *Toxicon* 71: 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.05.004>.
- C Warren Olanow, Olivier Rascol, Robert Hauser, Paul D Feigin, Joseph Jankovic, Anthony Lang, William Langston, Eldad Melamed, Werner Poewe, Fabrizio Stocchi, Eduardo Tolosa, ADAGIO Study Investigators. 2009. "A double-blind, delayed-start trial of rasagiline in Parkinson's disease." *The New England Journal of Medicine* 11.
- Caleo Matteo, Matteo Spinelli, Francesca Colossimo, and Ivica Matak. 2018. "Transynaptic Action of Botulinum Neurotoxin Type A at." *The Journal of Neuroscience* 9.
- Cui, M., Khanijou, S., Rubino, J., & Aoki, K. R. 2004. "Subcutaneous administration of botulinum toxin A reduces formalin-induced pain." *Pain* 125-133.
- Curtis, Michael J, Steve Alexander, Giuseppe Cirino, James R Docherty, Christopher H George, Mark A Giembycz, Daniel Hoyer, et al. 2018. "Experimental design and analysis and their reporting II: updated and simplified guidance for authors and peer reviewers." *British Journal of Pharmacology* 7.
- DeLong Mahlon, and Wichmann Thomas. 2015. "Changing views of basal ganglia circuits and circuit disorders." *Clinical EEG and Neuroscience* 7 .
- den Dunnen, Wilfred F A. 2013. "Neuropathological diagnostic considerations in hyperkinetic movement disorders." *Frontiers in neurology* 9.
- Filho, Tarcisio Eloy Pessoa de Barros, and Alessandra Eira Iague Sleiman Molina. 2008. "ANALYSIS OF THE SENSITIVITY AND REPRODUCIBILITY OF THE BASSO, BEATTIE, BRESNAHAN (BBB) SCALE IN WISTAR RATS." *Clinics* 103-8.
- Gerard E Francisco, Bandari Daniel S, Bavikatte Ganesh, Jost Wolfgang H, Manack Adams Aubrey, Largent Joan, and Esquenazi Alberto. 2017. "Adult Spasticity International Registry Study: methodology and baseline patient, healthcare provider, and caregiver characteristics." *Journal of rehabilitation medicine* 8.
- Hallett, Mark, and Antonio Pisani. 2008. "Neurophysiology of Dystonia: The Role of Inhibition." *Bone* 23 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>.

- Hassel, Bjørnar. 2013. "Tetanus: Pathophysiology, Treatment, and the Possibility of Using Botulinum Toxin against Tetanus-Induced Rigidity and Spasms." *Toxins* 5 (1): 73–83. <https://doi.org/10.3390/toxins5010073>.
- Hefferan, Michael, Tatsuya Fuchigami, and Martin Marsala. 2006. "Development of baclofen tolerance in a rat model of." *Neuroscience Letters* 6.
- Judaš, Miloš, and Ivica Kostović. 1997. *Temelji Neuroznanosti*. Zagreb: MD.
- Li, D., P. Matoo, and J. E. Keller. 2012. "New equine antitoxins to botulinum." *Biologicals* 7.
- Lundström, Erik, Anja Smits, Jörgen Borg, and Andreas Terént. 2010. "Four-Fold Increase in Direct Costs of Stroke Survivors with Spasticity Compared with Stroke Survivors without Spasticity: The First Year after the Event." *Stroke* 41 (2): 319–24. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.109.558619>.
- Matak, I., Riederer, P., & Lacković, Z. 2012. "Botulinum toxin's axonal trans-ort from periphery to the spinal cord." *Neurochemistry International* 236-239.
- Matak, I., Z. Lacković, and M. Relja. 2016. "Botulinum toxin type A in motor nervous." *Journal of Neural Transmission* 9.
- Matak, Ivica, Kata Bölcskei, Lidija Bach-Rojecky, and Zsuzsanna Helyes. 2019. "Mechanisms of Botulinum Toxin Type A Action on Pain." *Toxins* 24.
- Matak, Ivica. 2020. "Evidence for Central Antispastic Effect of Botulinum Toxin Type A." *British Journal of Pharmacology* 177 (1): 65–76. <https://doi.org/10.1111/bph.14846>.
- Matthews, Fishman, and Wittenberg. 2014. "TETANUS TOXIN REDUCES LOCAL AND DESCENDING REGULATION OF THE H-REFLEX." *Muscle Nerve* 8.
- Mazzocchio, Riccardo, and Matteo Caleo. 2015. "More than at the Neuromuscular Synapse: Actions of Botulinum Neurotoxin A in the Central Nervous System." *Neuroscientist* 21 (1): 44–61. <https://doi.org/10.1177/1073858414524633>.
- Paula Ruth L, Siongco, Rosales Raymond L, Moore Austen Pete, Freynhagen Rainer, Arimura Kimiyoshi, Kanovsky Petr, Kaji Ryuji, Fernandez Hubert H, and Dressler Dirk. 2020. "Botulinum neurotoxin injections for muscle-based (dystonia and spasticity) and non-muscle-based (neuropathic pain) pain disorders: a meta-analytic study." *Journal of neural transmmision* 17.
- Rosales, R. L., and D. Dressler. 2010. "On Muscle Spindles, Dystonia and Botulinum Toxin." *European Journal of Neurology* 17 (SUPPL. 1): 71–80. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2010.03056.x>.
- Simpson, David M, Mark Hallett, Eric J Ashman, Cynthia L Comella, Mark W Green, Gary S Gronseth, Melissa J Armstrong, et al. 2016. "Practice guideline update summary: Botulinum neurotoxin for the treatment of blepharospasm, cervical dystonia, adult spasticity, and

headache: Report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology." *Neurology* 9.

Trompetto, Carlo, Antonio Currà, Alessandro Buccolieri, Antonello Suppa, Giovanni Abbruzzese, and Alfredo Berardelli. 2006. "Botulinum Toxin Changes Intrafusal Feedback in Dystonia: A Study with the Tonic Vibration Reflex." *Movement Disorders* 21 (6): 777–82. <https://doi.org/10.1002/mds.20801>.

Taira Y, Marsala M. 1996. "Effect of proximal arterial perfusion pressure on function, spinal cord blood flow, and histopathologic changes after increasing intervals of aortic occlusion in the rat." *Stroke* 10.

Tarakad, Arjun, and Joseph Jankovic. 2017. "Diagnosis and Management of Parkinson's Disease." *Seminars in neurology* 9.

Welmer, Anna Karin, Magnus Von Arbin, Lotta Widén Holmqvist, and Disa K. Sommerfeld. 2006. "Spasticity and Its Association with Functioning and Health-Related Quality of Life 18 Months after Stroke." *Cerebrovascular Diseases* 21 (4): 247–53. <https://doi.org/10.1159/000091222>.

Zorowitz Richard, Gillard Patrick, Brainin Michael. 2013. "Poststroke spasticity: sequelae and burden on stroke survivors and caregivers." *Neurology* 8.

12. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 7.1.1997. godine u Zagrebu, gdje sam i završila svoje obavezno obrazovanje u OŠ Pavleka Miškine i V. Gimnaziji. Od 7.godine života sam znala da želim upisati Medicinski fakultet u Zagrebu, te sam 2015. godine i uspjela u tom naumu. Tijekom svog fakultetskog obrazovanja, najviše sam ponosna na članstvo i rad u Studentskoj sekciji za neuroznanost, čija sam predsjednica do kraja ove akademske godine. Od mnogih projekata sekcije, najveći, studentski kongres zvan "Diskursi shizofrenije" je nagrađen Posebnim priznanjem rektora. Zajedno s kolegama iz sekcije sudjelovala sam pisanju preglednog rada o Cirkadijanom ritmu, koji do sada na Research Gateu broji 25 citiranja. Svoju želju za širenjem fascinacije o neuroznanosti ispunila sam kao demonstrator na kolegiju Temelji neuroznanosti. Radi istog razloga sam se i odlučila upoznati sa znanstvenim radom na Zavodu za farmakologiju, a konačni produkt je bila Dekanova nagrada za 2019./2020. godinu, odnosno ovaj diplomski rad. Rad smo također u obliku postera kolegica i ja predstavile na kongresu Hrvatskog društva farmakologa 2019. godine. Međutim, želja za klinikom nije popustila te sam s kolegama i dragom prof. Santini s Klinike za infektivne bolesti Fran Mihaljević napisala rad o rijetkom slučaju uveitisa, koji smo i prezentirali na kongresu infektologa i mikrobiologa u Splitu. Posljednju pandemijsku godinu studija provela sam volontirajući na trijaži bolnice Fran Mihaljević, u sklopu projekta Studentske sekcije za infektologiju.

U slobodno vrijeme volim duge šetnje i svježe cvijeće. Udišem kisik i glazbu, zadnjih godinu dana pogotovo onu iz 60-tih. Učim šivati na šivaćoj mašini te se nadam jednog dana imati svoju kolekciju večernjih haljina.

Nadam se da će me daljnji medicinski put odvesti prema nečem neurološkom i kirurškom.