

Dugotrajni učinci toksina botulina tipa A na pokazatelje motoričke funkcije u štakora

Matić, Magdalena

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:462678>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Magdalena Matić

**Dugotrajni učinci toksina botulina tipa A na
motoričke funkcije u štakora**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2022.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za molekularnu neurofarmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Ivice Mataka, znanstvenog suradnika na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te prof. dr. sc. Dubravke Hranilović, redovite profesorice na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar/magistra eksperimentalne biologije.

Zahvaljujem se dr. sc. Ivici Mataku na pruženoj prilici za izradu ovoga rada te strpljenju, trudu i volji prilikom dijeljenja svog znanja kroz cijeli eksperiment.

Zahvaljujem se profesorici Dubravki Hranilović na podršci te nadahnuću neurofiziologijom.

Posebno hvala Petri na pomoći, odvojenom vremenu i društvu.

Hvala i svima onima koji direktno nisu bili uključeni u eksperiment, a pružaju mi podršku i ljubav kroz život: posebno roditeljima, dečku Peri i sestri Loreni.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište U Zagrebu

Prirodoslovno-matematički Fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Dugotrajni učinci toksina botulina tipa A na motoričke funkcije u štakora

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

SAŽETAK

Toksin botulina tipa A (BoNT/A), neurotoksin koji uzrokuje mlohavu paralizu mišića, koristi se u kontroli nevoljnih pokreta i spazma kod distonija i spasticiteta. Međutim, korisni motorički učinci kod navedenih poremećaja i njihovo trajanje se ne mogu objasniti isključivim paralitičkim djelovanjem toksina na neuromuskularne veze, a nedavne studije upućuju na moguće središnje učinke. Stoga smo ovdje istražili središnje djelovanje toksina na bihevioralne pokazatelje motoričke funkcije. Štakorima je bilateralno injiciran BoNT-A u *m. gastrocnemius* (2 U/kg) ili *n. ischiadicus* (5 U/kg). Za istraživanje uloge središnje transcitoze BoNT-A u središnje sinapse, životinje su intratekalno injicirane antitoksinom (5 i.u.). Učinak BoNT-A je ispitivan različitim motoričkim testovima za evaluaciju mlohavne paralize, hoda i plivanja, izdržljivosti, koordinacije, te mišićne atrofije, ali i pomoću imunohistokemijske detekcije njegovog enzimskog produkta u presjecima leđne moždine. Utvrđeno je da je kombinacija perifernog i središnjeg učinka BoNT-A intenzivnija i dugotrajnija od njegovog izoliranog perifernog učinka. Središnji učinci BoNT-A posredovani transcitozom su uglavnom ograničeni na kolinergične sinapse interneurona leđne moždine. Ovi nalazi upućuju da središnje djelovanje pojačava intenzitet i produljuje trajanje učinka BoNT-A na motoričke funkcije štakora. Stoga bi dugotrajnost terapijskih učinaka toksina, gdje je cilj kontrola aktivnosti i tonusa mišića, mogla ovisiti o njegovom središnjem djelovanju.

(60 stranica, 28 slika, 1 tablica, 86 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

KLJUČNE RIJEČI: središnje djelovanje, transcitoza, atrofija

Voditelj: dr. sc. Ivica Matak, znanstveni suradnik

Ocjenitelji:

prof. dr. sc. Dubravka Hranilović, redovita profesorica

prof. dr. sc. Biljana Balen, redovita profesorica

prof. dr. sc. Duje Lisičić, izvanredni profesor

Zamjena:

doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević, docentica

Datum prihvatanja rada: 31. ožujka 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Master thesis

Long-term effects of botulinum toxin type A on motor performances in rats

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

ABSTRACT

Botulinum toxin type A (BoNT/A), a neurotoxin that causes flaccid muscle paralysis, is used to control involuntary movements and spasms in dystonia and spasticity. However, beneficial motor effects in these disorders and their duration cannot be explained by the exclusive paralytic action of the toxin on neuromuscular junctions, while recent studies suggest possible central effects. Therefore, here we investigated the central effect of toxins on behavioral indicators of motor function. Rats were bilaterally injected with BoNT-A in *m. gastrocnemius* (2 U/kg) or *n. ischiadicus* (5 U/kg). To investigate the role of BoNT-A transcytosis in central synapses, animals were injected intrathecally with antitoxin (5 i.u.). The effect of BoNT-A was examined by various motor tests to evaluate flaccid paralysis, gait and swimming, endurance, coordination and muscle atrophy, but also by immunohistochemical detection of its enzyme product in the spinal cord sections. The combination of the peripheral and central effects of BoNT-A was found to be more intensive and longer than its isolated peripheral effect. The central effects of transcytosis-mediated BoNT-A are mainly limited to cholinergic synapses of spinal interneurons. These findings suggest that the central action intensifies and prolongs the duration of the effect of BoNT-A on rat motor functions. Therefore, the longevity of the clinical effects of the toxin and its main therapeutic goal to control muscle activity and tone could depend on its central action.

(60 pages, 28 figures, 1 table, 86 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

KEYWORDS: central action, transcytosis, atrophy

Supervisor: Ivica Matak, PhD, research associate

Reviewers:

prof. Dubravka Hranilović, PhD, full professor

prof. Biljana Balen, PhD, full professor

prof. Duje Lisičić, PhD, associate professor

Replacement:

doc. Ana Sofia Blažević. PhD, assistant professor

Thesis acceptance date: March 31st 2022

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Toksin botulina	1
1.2. Motorički sustav i živčani sustav	3
1.3. Mehanizam djelovanja BoNT	12
1.4. Poznati učinci i primjena BoNT	15
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	20
3. MATERIJALI I METODE	21
3.1. Eksperimentalne životinje	21
3.2. Eksperimentalne tvari	21
3.2.1. BoNT/A	21
3.2.2. Antitoksin	22
3.2.3. Normalni konjski serum	22
3.2.4. Fiziološka otopina	22
3.2.5. Ostale tvari	22
3.3. Eksperimentalni postupci	23
3.3.1. Eksperimentalni dizajn	23
3.3.2. Injiciranje eksperimentalnih tvari	24
3.3.3. Žrtvovanje i obrada tkiva	26
3.4. Eksperimentalne metode	27
3.4.1. Bihevioralni testovi	27
3.4.1.1. Refleks širenja nožnih prstiju (DAS)	28
3.4.1.2. Otpor pri dorzifleksiji tibiotarzalnog zgloba	28
3.4.1.3. Hodanje i držanje (<i>gait ability</i>)	29
3.4.1.4. Hodanje po šipci (<i>beam walking</i>)	29
3.4.1.5. Rotarod	30
3.4.1.6. Atrofija	31
3.4.1.7. Plivanje	31
3.4.2. Imunohistokemija	32
3.4.3. Mikroskopiranje	33
3.4.4. Statistička obrada podataka	33
4. REZULTATI	35
4.1. Mlohava paraliza udaljenih mišića zaduženih za abdukciju nožnih prstiju	35
4.2. Učinci BoNT-A na hod i držanje	36

4.3.	Koordinacija i izdržljivost	41
4.4.	Plivanje	42
4.5.	Atrofija	43
4.6.	Imunohistokemija	47
5.	RASPRAVA	49
5.1.	Dugotrajni motorički učinci BoNT-A u motoričkom sustavu	49
5.2.	Djelovanje BoNT posredovano transcitozom	51
6.	ZAKLJUČAK	53
7.	LITERATURA	54
8.	ŽIVOTOPIS	61

KRATICE

BoNT - neurotoksin botulina

BoNT/A – serotip A neurotoksina botulina

BoNT-A – terapijski pripravak serotipa A neurotoksina botulina

SNAP-25 - sinaptosomalni protein molekulske mase 25 kDa

SNARE – receptor za topivi faktor osjetljiv na N-etilmaleimid

NTNHA - netoksični, nehemaglutininski protein

M-PTC - minimalni progenitorski kompleks toksina

L-PTC - veliki progenitorski kompleks toksina

CNS - središnji živčani sustav

MAP - mikrotubulu pridružen protein

VAMP - membranski protein pridružen vezikuli; sinaptobrevin

NMJ - neuromuskularna veza

ACh - acetikolin

AChR - receptor acetilkolina

ChAT - kolin-acetiltransferaza

VAcHT - vezikularni transporter acetilkolina

AChE - acetilkolinesteraza

ATP - adenzin trifosfat

Ia - primarna aferentna vlakna

II - sekundarna aferentna vlakna

SV2 - protein sinaptičke vezikule tipa 2

FGFR3 – receptor faktora rasta fibroblasta tipa 3

TeNT - toksin tetanusa

n. - živac

m. - mišić

GTP - gvanozin-5'-trifosfat

CMAP – zbrojni mišićni akcijski potencijal

CGRP - peptid povezan s genom za kalcitonin

TRPV1 - vaniloidni kationski kanal prolaznog potencijala tipa 1

NK-1 - neurokininski receptor tipa 1

EMA - Europska agencija za lijekove

WHO - Svjetska zdravstvena organizacija

NN - Narodne novine

U - standardna internacionalna jedinica potentnosti tvari

LD₅₀ - medijan letalne doze

HRP - peroksidaza hrena

i.m. - intramuskularno

i.n. - intraneuralno

i.t. - intratekalno

i.u. - internacionalna jedinica

BSA - goveđi serumski albumin

PBS - fosfatom puferirana fiziološka otopina

PBST - fosfatom puferirana fiziološka otopina s Triton deterdžentom

NGS - normalni kozji serum

HS - konjski serum

ATX - antitoksin

DAS - skor abdukcije prstiju

SEM - standardna pogreška aritmetičke sredine

ANOVA - analiza varijance

ALS - amiotrofična lateralna skleroza

SOD1 - superoksid-dismutaza tipa 1

1. UVOD

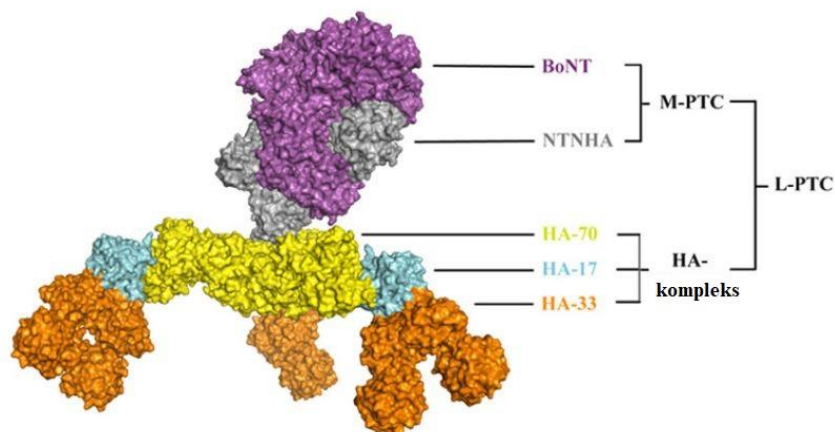
1.1. Toksin botulina

Toksini botulina (engl. *Botulinum neurotoxins*, BoNTs,) poznati i kao jedni od najsnažnijih neurotoksina, produkti su metabolizma gram-pozitivnih anaerobnih bakterija roda *Clostridium* koje se u prirodi nalaze u tlu. Pri sistemske primjeni toksina u ljudi, procijenjena medijalna letalna doza (LD₅₀) serotipa A (BoNT/A) iznosi 1 ng/kg (Gill, 1982). Postoji šest bakterijskih sojeva koji proizvode BoNT, od čega su četiri unutar vrste *Clostridium botulinum*, dok preostala dva pripadaju vrstama *Clostridium baratii* i *Clostridium butyricum*. Osim supstratom, svaka od grupa definirana je zasebnim optimalnim uvjetima za rast: temperaturom, pH, količinom vode i kisika, te koncentracijom natrijeva klorida (Peck, 2009; Sakaguchi, 1982). Međutim, ako povoljni uvjeti izostaju, bakterije opstaju u obliku endospora što pored lučenja toksina predstavlja dodatni mehanizam njihove virulencije. Prestankom stresnih uvjeta u okolišu, endospore izlaze iz faze dormancije, čime je sačuvan genetički materijal (Dürre, 2014). Endospore različitih grupa sojeva također se razlikuju po otpornosti na povišenje temperature (Peck, 2009).

U odnosu na endotoksine, egzotoksini poput BoNT su isključivo proteini koji izazivaju snažan imunski odgovor, termolabilni su i iznimno toksični. Danas je poznato osam serotipova (A-G, X) BoNT s podtipovima koje proizvode spomenute grupe bakterija roda *Clostridium* (Zhang i sur., 2017). Kako nastaju iz različitih sojeva (tipičnih za pojedina tla), serotipovi neurotoksina su tipično geografski distribuirani, od čega se samo serotip A i B mogu pronaći na svim kontinentima izuzev Antarktike (Macdonald i sur., 2011; Peck, 2009). Za sve serotipove vrijedi da inhibiraju lučenje acetilkolina na okončinama aksona, što blokira prijenos akcijskog potencijala i posljedično uzrokuje paralizu mišića. Međutim, mehanizmi njihova djelovanja, ciljni proteini koje cijepaju te opća potentnost za intoksicirani organizam, međusobno se razlikuju (Dressler i sur., 2005). Molekule neurotoksina imaju heterodimernu strukturu takozvanog AB proteina koji je sačinjen od A (laki lanac) i B podjedinice (teški lanac). Na karboksilnom kraju B podjedinice nalazi se domena koja posreduje u vezanju toksina na ciljnu stanicu, dok se na amino-kraju nalazi translocirajuća domena koja dostavlja podjedinicu A u citoplazmu stanice (Matak i Lacković, 2014; Gonzalez i sur., 2007). Laki lanac nositelj je izvršne funkcije toksina koja se odnosi na proteaznu aktivnost. Konkretno, serotip A, koji je u terapijske svrhe najviše istražen, ulaskom lakog lanca u citosol, djeluje kao metaloproteinaza ovisna o cinku. Pritom cijepa sinaptosomalni protein molekulske mase 25 kDa (SNAP-25, engl. *Synaptosomal-associated protein of 25 kDa*), odnosno, protein receptora (proteinski kompleks) koji veže toplivi faktor osjetljiv na N-etilmaleimid (SNARE, engl. *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*). Na taj se način inhibira neuroegzocitoza, s obzirom da SNAP-25 posreduje u vezanju vezikula

ispuštenih neurotransmiterom acetilkolinom za presinaptičku membranu, ali i fuziji dviju membrana, čime bi se acetilkolin lučio u sinaptičku pukotinu (Dressler i sur., 2005).

Operoni na kojima se nalazi uputa za sintezu neurotoksina sadrže i gene za netoksične proteine koji također nastaju u početnom proteinskom kompleksu, a za neurotoksine su vezani nekovalentno. Takvi klasteri gena uobičajeno se nalaze na mobilnim elementima, poput bakteriofaga, što omogućava relativno jednostavan horizontalan prijenos između bakterija sličnog i istog staništa. Funkcija netoksičnih, pomoćnih proteina je zadržati formu toksina koja bi podržala transport kompleksa gastrointestinalnim traktom, a potom i translokaciju kroz epitel crijeva u cirkulaciju kojom dolazi do neurona (Brunt i sur., 2018). U progenitorskom kompleksu serotipa A četiri su netoksična proteina – netoksični, nehemaglutininski protein (NTNHA, engl. *Non-toxic non-hemagglutinin*) i tri hemaglutinina (HA33, HA17 i HA70), pri čemu je uloga NTNHA zaštititi kompleks od proteolize u transportu crijevima, dok je za prihvaćanje za stijenku crijeva od važnosti komponenta kompleksa koja sadrži hemaglutinine. Pritom dolazi do specifičnog vezanja na površinske ugljikohidrate stanica epitela. S obzirom na prostorni razmještaj i funkciju koja iz njega proizlazi, kompleks proteina podijeljen je na minimalni progenitorski kompleks toksina (M-PTC, engl. *Minimal progenitor toxin complex*), što je zapravo heterodimer sačinjen od BoNT i NTNHA (strukturno vrlo sličan BoNT, no bez domene s funkcijom metaloproteinaze) te na hemaglutinine (Pirazzini i sur., 2017). Zajedno s hemaglutininima, M-PTC čini veliki progenitorski kompleks toksina (L-PTC, engl. *Large progenitor toxin complex*) (Slika 1.) (Yao i sur., 2014). Neurotoksin se nakon sinteze nalazi u inaktivnom obliku, odnosno, laki i teški lanac vezani su disulfidnom vezom, hidrofobnim i ionskim vezama te čine jedan polipeptidni lanac molekulske mase oko 150 kDa. Proteolitičkim cijepanjem endopeptidaze u serotipa A, on se aktivira te nastaju zasebni laki lanac od 50 kDa i teški lanac od 100 kDa (i dalje vezani disulfidnom vezom) čime je omogućena opisana funkcija BoNT (Kukreja i sur., 2010).



Slika 1. Površinska grada velikog progenitorskog kompleksa BoNT/A (L-PTC); slika je preuzeta i prilagođena iz Yao, G., Lee, K., Gu, S., Lam, K. H., i Jin, R. (2014). Botulinum neurotoxin A complex recognizes host carbohydrates through its hemagglutinin component. *Toxins*, 6(2), 624-635.

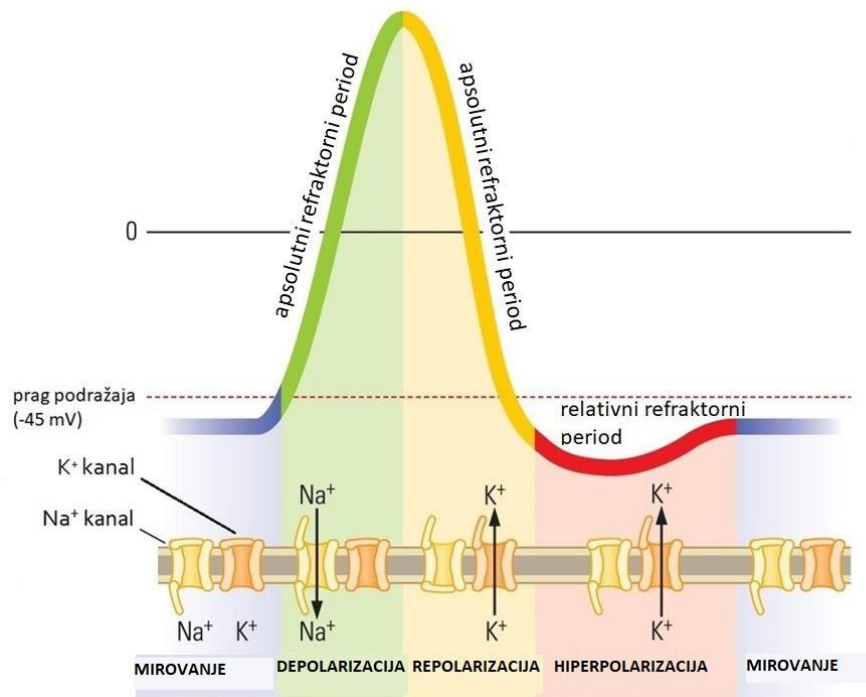
Naziv botulizam potječe od latinske riječi *botulus*, što znači kobasica. U najranijim vremenima poznavanja bolesti, prije oko 2000 godina, u Europi se taj termin koristio za akutno trovanje suhomesnatom hranom. Godine 1897. belgijski bakteriolog Émile Pierre-Marie van Ermengem iz jetri umrlih i šunke koju su konzumirali izolirao je uzročnika bolesti, anaerobnog bacila koji formira endospore i dodijelio mu naziv *Bacillus botulinus*. Konačno, infekcijom zdravih eksperimentalnih životinja čistim kulturama uz prateće simptome paralize i smrt, koji su bili prethodno prisutni i u inficiranih ljudi, zadovoljeni su Kochovi postulati u mikrobiologiji (Sakaguchi, 1982). Od botulizma mogu bolovati i ljudi i životinje, a tri su glavna načina oboljenja: intoksikacijom putem hrane (u hrani se nalazi sintetizirani neurotoksin), infekcijom putem hrane (spore ingestijom dolaze u crijeva te nakon kolonizacije bakterije ondje sintetiziraju BoNT), te infekcijom rane (bakterije rastu i proizvode BoNT u rani, odakle se toksin dalje širi krvotokom), što se najčešće odnosi na oštre metalne predmete, primjerice nečiste igle (Peck, 2009). U ljudi bolest nastupa 12-36 sati nakon unosa uzročnika, a karakterizira ju simetrično, brzo slabljenje tijela. Mlohava paraliza mišića rezultat je blokade kolinergičke transmisije u neuromuskularnoj vezi što onemogućava voljne pokrete. Također, dolazi do blokade sinaptičke transmisije između živčanih završetaka autonomnog živčanog sustava i njihovih efektornih tkiva poput glatkih mišića i egzokrinih žlijezda, što uzrokuje disautonomiju. S obzirom da paraliza započinje od kranijalnih živčanih vlakana nadolje, slabost mišića početno se osjeti na području mišića lica, a potom i vrata, sa širenjem prema mišićima trupa i ekstremiteta. Uobičajeni simptomi su vrtoglavica i glavobolja, spuštanje očnih kapaka, zamagljen i dvostruki vid, dilatacija zjenica, nerazgovijetan govor, suhoća usne šupljine i ostalih sluznica, otežano gutanje i disanje, te opstipacija. Ako dođe do smrti, to je uglavnom zbog paralize dišnih mišića, prvenstveno dijafragme. Botulizam se simptomatski liječi nadomještanjem oduzete funkcije mišića za gutanje i disanje. Za potpomognuto disanje koriste se mehanička ventilacija, a za hranjenje nazogastrična sonda. Specijalna terapija podrazumijeva uporabu antitoksina, odnosno poliklonskih protutijela dobivenih imunizacijom konja. Takva se terapija koristi za oboljenja od serotipova A, B, E i F toksina, koji izazivaju bolest u ljudi (Macdonald i sur., 2011; Hatheway, 1988).

1.2. Motorički sustav i živčani sustav

Posljedice toksičnih učinaka BoNT na organizam lako se zapažaju na razini organskog sustava. Međutim, promjene koje se događaju na razini su molekula, za što je važno razumjeti građu i organizaciju motoričkog i živčanog sustava. Anatomski, živčani sustav dijeli se na centralni (središnji), kojeg čine mozak i leđna moždina, te periferni, čije puteve čine neuroni putem kojih informacija s periferije dopire u središnji živčani sustav (CNS, engl. *Central nervous system*), ali i iz središnjeg dijela na periferiju. Također, funkcionalno se živčani sustav dijeli na senzorički (afarentni) te motorički (eferentni). Senzorički neuroni donose informaciju s periferije prema središnjem živčanom sustavu, a motorički od središnjeg živčanog sustava prema periferiji. Međutim, između senzoričkih i motoričkih

neurona nalazi se niz interneurona koji sudjeluju u oba spomenuta puta. U okviru eferentnog puta razlikuju se autonomni te somatski dio živčanog sustava. Autonomni živčani sustav inervira unutarnje organe i žlijezde te djeluje bez kontrole svijesti putem simpatikusa, aktivnog u stanju stresa za organizam („*fight or flight*“ situacije) i parasimpatikusa, aktivnog u stanju opuštenosti organizma („*rest and digest*“ situacije). S druge strane, somatski živčani sustav, pod utjecajem volje, inervira skeletne mišiće. Struktura neurona u funkciji je njihove međusobne komunikacije, a to se odnosi na njihov oblik, citoskelet te ionske kanale regulirane naponom. Živčana stanica dijeli se na dendrite – izdanke kojima neuron prima informaciju od drugog neurona, tijelo (somu), gdje se nalaze organeli stanice te sintetizirane biološke makromolekule, akson – vlakna putem kojih se prenosi električni živčani impuls te aksonske završetke koji se nalaze na kraju aksona i istu informaciju prenose na sljedeći neuron u nizu kemijskim putem. Citoskelet neurona sačinjen je od tri tipa proteina - neurofilamenata koji mu daju čvrstoću, mikrofilamenata (aktina) u rastućim dijelovima neurona, te mikrotubula putem kojih se odvija komunikacija između aksona i dendrita sa somom (Kolb i Whishaw, 2021). Protein tubulin tvori mikrotubule uz čije dinamičke elemente djeluju dodatni, mikrotubulu pridruženi proteini (MAPs, engl. *Microtubule-associated proteins*). MAPs reguliraju aktivnost ključnih motora mikrotubula koji posreduju u anterogradnom te retrogradnom transportu molekula kroz neuron. Pritom, interakcija s molekulama koje se transportiraju zasniva se na vezanju s proteinima na pozitivno nabijenim, rastućim krajevima mikrotubula. Ključni protein za odvijanje anterogradnog transporta, od some prema aksonskom završetku, jest kinezin, a protein za odvijanje retrogradnog transporta, od aksonskih završetaka do some, jest dinein (Goldstein i Yang, 2000). Funkcija anterogradnog transporta jest prijenos organela, vezikula i proteina nakon sinteze do aksonskih završetaka gdje djeluju, dok je funkcija retrogradnog transporta poticanje transkripcije i sinteze tvari u somi. Ionski kanali – za kalijeve, natrijeve te kalcijeve ione (samo na aksonskim završecima) na neuronima su voltažni, dakle, otvaraju se i zatvaraju potaknuti promjenom membranskog potencijala (razlike u nabijenosti područja van i unutar membrane) u neposrednoj blizini neurona. Kationi tako smanjuju razliku membranskog potencijala (koji u mirovanju iznosi -70 mV), dok anioni povećavaju razliku membranskog potencijala. Otvaranjem natrijevih i kalijevih kanala ioni ulaze u dendrite, difuzijom dolaze do područja aksonskog brežuljka (područje gdje završava soma, a započinje akson), te tamo, ako je razlika membranskog potencijala dosegla -45 mV ili više, nastaje akcijski potencijal, čime započinje prijenos živčane informacije električnim putem. Akcijski potencijal se sastoji od dvije faze koje nastupaju naglo i odvijaju se vrlo brzo – depolarizacije i repolarizacije (**Slika 2.**). Faza depolarizacije započinje otvaranjem natrijevih kanala, čime natrijevi ioni ulaze u stanicu. Nakon što se natrijevi kanali inaktiviraju, s obzirom da se otvaraju sporije, kalijevi kanali tek počinju propuštati kalijeve ione iz stanice te time započinje faza repolarizacije. Kada se dosegne potencijal mirovanja, kanali se počinju zatvarati. Međutim, kako se kalijevi kanali i zatvaraju sporije od natrijevih, kalijevi ioni još neko vrijeme izlaze iz neurona te dovode do faze hiperpolarizacije. Tada membranski potencijal biva još negativniji nego li je u stanju mirovanja. Svojstvo inaktivacije kanala osigurava za živčane stanice fazu mirovanja,

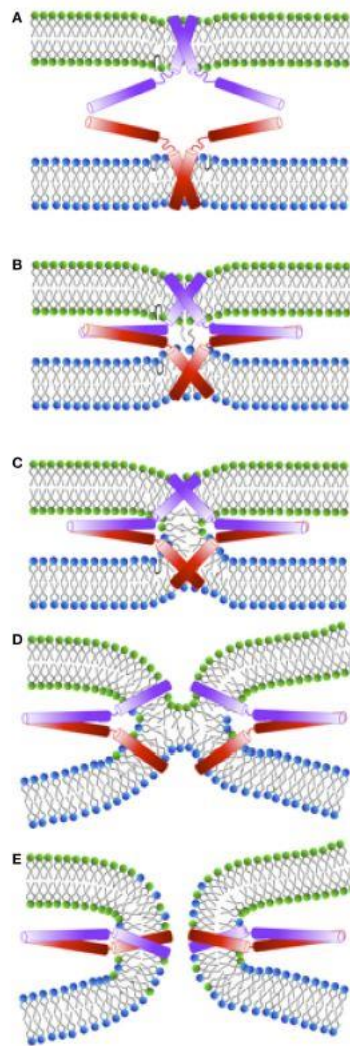
odnosno, refraktorni period, kada ne može nastati novi akcijski potencijal. Time je omogućeno zadržavanje motiva akcijskog potencijala, kao i njegovo jednosmjerno širenje. Akcijski potencijal prenosi se mijeliziranim živčanim vlaknima skokovito, u područjima Ranvierovih čvorova (gdje izostaje mijelinska ovojnica), što osigurava brz prijenos informacije općenito u kralježnjaka (Kolb i Whishaw, 2021).



Slika 2. Faze akcijskog potencijala; slika je preuzeta i prilagođena iz Kolb, B., i Whishaw, I. Q. (2021). Fundamentals of human neuropsychology. Macmillan, 452.

Kako bi živčanim sustavom do mišića došao signal o pokretu koji predstoji, signal akcijskog potencijala, dolaskom do aksonskih završetaka, prenosi se kemijski putem molekula neurotransmitera na sljedeći neuron (osim u slučaju kada su presinaptička i postsinaptička membrana fuzionirane). Vežu između dva neurona u nizu čini sinapsa, jedinica građena od aksonskog završetka presinaptičkog neurona, sinaptičke pukotine te dendritičke membrane postsinaptičkog neurona. Dolaskom akcijskog potencijala na okončine aksona te posljedičnom promjenom potencijala membrane tog područja neurona, otvaraju se kalcijevi kanali kojima ioni kalcija ulaze u stanicu. Uloga kalcija je potaknuti egzocitozu neurotransmitera u sinaptičku pukotinu, primarno aktivacijom proteina sinaptotagmina 1, poznatog i kao senzor za kalcijeve ione. Sinaptotagmin, koji je usidren u membrani vezikula s pohranjenim neurotransmiterima, se svojom C2 domenom veže za membranske fosfolipide što dovodi do iskrivljenja membrane (i posljedične fuzije s presinaptičkom membranom), ali i otpuštanja ostalih proteina stabilizatora nepotpunih SNARE kompleksa (koji sudjeluju u njihovom formiranju), prije svega kompleksina i Munc (McMahon i sur., 2010). Pritom dolazi do povezivanja jednog SNARE motiva

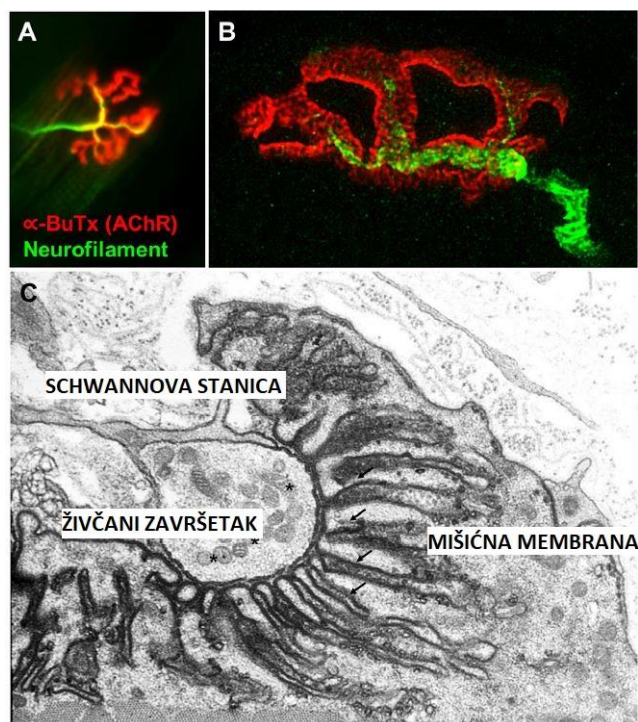
sinaptobrevina (VAMP, engl. *Vesicle associated membrane protein*) membrane vezikula te dva motiva SNAP-25 i jednog motiva sintaksina presinaptičke membrane u SNARE kompleks, čijim horizontalnim zavijanjem ukupno četiri paralelna heliksa (prelaskom iz *trans*- u *cis*- konfiguraciju), posredovano sinaptotagminom, dolazi do fuzije dviju membrana te nastanka pore (**Slika 3.**) (Han i sur. 2017). Nakon izlučivanja u sinaptičku pukotinu, neurotransmiteri se na postsinaptičkoj membrani mogu vezati za dva tipa receptora - ionotropni (kalcijevi, kalijevi ili kloridni kanali regulirani ligandom) te metabotropni (vezani za G protein), što će, nakon ulaska dovoljne količine kationa kroz ionske kanale potaknuti prijenos akcijskog potencijala. Za svaku sinapsu karakterističan je jedan neurotransmiter, no neuroni tvore brojne sinapse te nastanak akcijskog potencijala u svakom postsinaptičkom neuronu ovisi o zbroju ekscitacijskih i inhibicijskih potencijala, pri čemu on mora dati minimalan prag podražljivosti od -45 mV (Kolb i Whishaw, 2021).



Slika 3. Koraci u fuziji membrana vezikula i presinaptičkog neurona posredovanoj inicijalnom interakcijom sinaptobrevina (crveno) i sintaksina (ljubičasto); slika je preuzeta i prilagođena iz Han, J., Pluhackova, K., i Böckmann, R. A. (2017). The multifaceted role of SNARE proteins in membrane fusion. *Frontiers in physiology*, 8, doi: 10.3389/fphys.2017.00005

Nakon što se signal o pokretu prenese nizom neurona, on konačno dolazi do mišića. Neuromuskularna veza (NMJ, engl. *Neuromuscular junction*) podrazumijeva sinapsu između fino razgranatog, nemijeliniziranog kraja aksona motoričkog neurona te mišića. Ogranci aksona okruženi su Schwannovim stanicama te su ugniježdeni u uleknuća mišićnih vlakana na području motoričke završne ploče (dio površine mišića koji sudjeluje u NMJ tvoreći postsinaptičku membranu) (**Slika 4.**). Schwannove stanice sudjeluju u formiranju i održavanju sinapse (nakon podrezivanja svih aksona koji neće tvoriti NMJ) te remodeliranju aksona u slučaju oštećenja (Cruz i sur., 2020). Acetilholin (ACh, engl. *Acetylcholine*), neurotransmitter koji se pritom izlučuje u sinaptičku pukotinu se sintetizira na okončinama neurona, pohranjuje u vezikulama te inaktivira enzimski, razgradnjom u sinaptičkoj

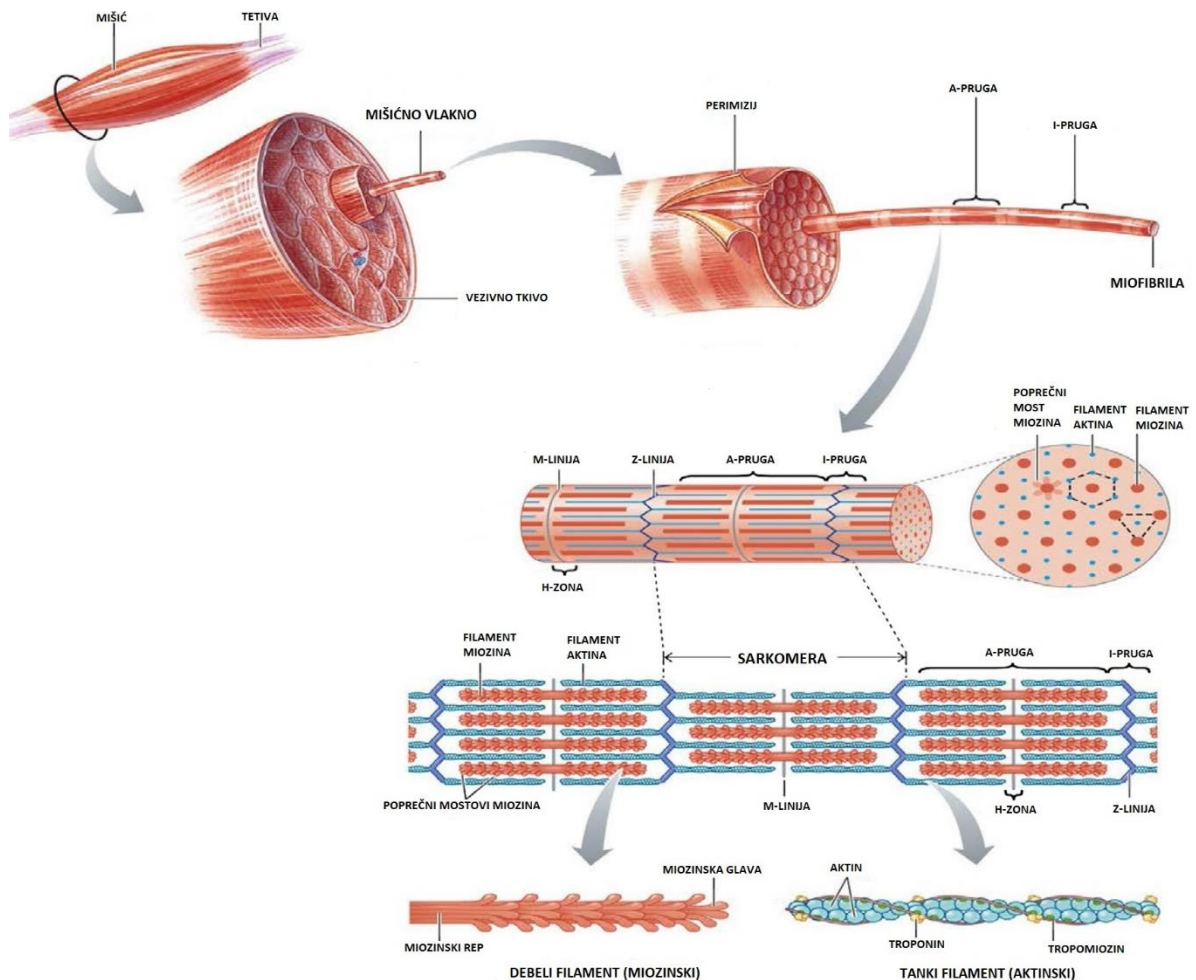
pukotini. Iako kolinergični neuroni tipično sudjeluju u NMJ, veće populacije mogu se pronaći u neuronima parasimpatikusa te u srednjem i bazalnom dijelu prednjega mozga. Osim u kontroli motorike, acetilkolin sudjeluje u kontroli endokrinih funkcija, pamćenja te osjeta boli (Ahmed i sur., 2019). Površina postsinaptičke membrane uvijena je čime joj je povećana površina, ali i gustoća receptora acetilkolina (AChR, engl. *Acetylcholine receptor*). Na dnu nabora nalaze se natrijevi kanali čijim otvaranjem dolazi do ekscitacije membrane (Cruz i sur., 2020). Prekursori za sintezu ACh su kolin te acetat koji se unose hranom, a u živčani sustav dospijevaju krvlju. Kolin je nusprodukt razgradnje masti iz hrane poput jaja ili avokada, dok je acetat komponenta kiselih namirnica poput limuna ili octa. Unutar sinapse acetyl-koenzim A prenosi acetylnu skupinu na kolin uz pomoć enzima kolin-acetyltransferaze (ChAT, engl. *Choline acetyltransferase*). ACh se pomoću vezikularnog transportera (VAcHT, engl. *Vesicular acetylcholine transporter*) unosi u vezikule, a potom izlučuje nastankom akcijskog potencijala u α -motoričkom neuronu, i to na sljedeći način: akcijski potencijal potakne aktivaciju naponom reguliranih kalcijevih kanala, čime je potaknuta opisana egzocitoza vezikula. Nadalje, ACh se veže na ionotropne, nikotinske receptore postsinaptičke membrane, a kada se svi receptori zasite, ostatak ACh u sinaptičkoj pukotini razgrađuje se enzimom acetilkolinesterazom (AChE, engl. *Acetylcholine esterase*). Dio acetata i kolina tada se recikliraju, odnosno, vraćaju u presinaptički neuron i služe pri sljedećoj sintezi ACh (Cruz i sur., 2020; Kolb i Whishaw, 2021).



Slika 4. Prikaz neuromuskularne veze fluorescencijskim mikroskopom (A), konfokalnim mikroskopom (B) te elektronskim mikroskopom (C) pri čemu je α -BuTx oznaka za α -bungarotoksin koji se koristio za fluorescencijsko obilježavanje receptora acetilkolina (crveno); slika je preuzeta i prilagođena iz Cruz, P. M. R., Cossins, J., Beeson, D., i Vincent, A. (2020). The neuromuscular junction in health and disease: molecular mechanisms governing synaptic formation and homeostasis. *Frontiers in molecular neuroscience*, 13, doi: 10.3389/fnmol.2020.610964.

Mišići su građeni od mišićnog tkiva, krvnih žila te motoričkih neurona koji ih inerviraju, a okružuje ih vezivno tkivo poznato kao epimizij. U poprečnom prerezu mišića uočljivo je kako mišićno tkivo tvore mišićna vlakna odvojena vezivnim tkivom zvanim perimizij. Nadalje, svako mišićno vlakno (jedna mišićna stanica) sačinjeno je od mnoštva miofibrila, koje čine sarkomere u seriji (**Slika 5**). Sarkomere su funkcionalne jedinice mišića koje se sastoje od naizmjeničnih, međusobno paralelnih, proteinskih filamenata aktina i miozina na čijem se međudjelovanju, uz djelovanje pomoćnih molekula poput troponina, tropomiozina, nebulina, titina, te distrofina, temelji mišićna kontrakcija. Izvor energije za rad koji obavlja miozin (veže se za aktinska vlakna i time sabija sarkomeru) jest adenzin trifosfat (ATP, engl. *Adenosine triphosphate*) koji se hidrolizira na miozinskoj glavi (Frontera i Ochala, 2014). Međutim, u interakciji aktina i miozina posreduju ioni kalcija koji se luče iz terminalnih cisterni sarkoplazmatskog retikuluma. Terminalne cisterne su u interakciji s T tubulima (što se naziva trijadom), invaginacijama sarkoleme smještenih u sarkoplazmi mišićnih vlakana čija je funkcija prijenos živčanog impulsa do unutrašnjosti mišićnog vlakna te posljedično otvaranje kalcijevih kanala, a time i sinkronizirani odgovor vlaknaca pri kontrakciji nekog mišića. Neposredna blizina elemenata trijade te kanali propusni za ione kalcija koji se nalaze na njihovim membranama osiguravaju, s obzirom na

koncentraciju kalcija, brzu promjenu razine pozitivno nabijenih iona u sarkoplazmi (Jayasinghe i Launikonis, 2013).



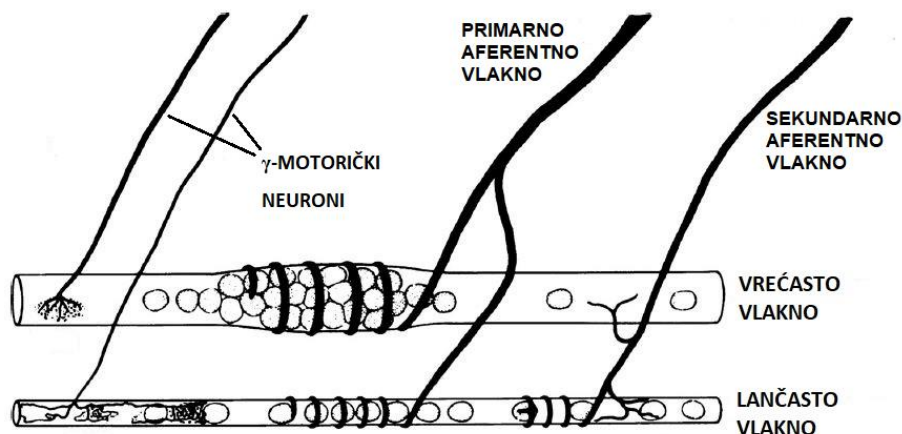
Slika 5. Struktura skeletnog mišića; slika je preuzeta i prilagođena iz Frontera, W. R., i Ochala, J. (2015).

Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcified tissue international*, 96(3), 183-195.

Mehanički podražaji registrirani mehanoreceptorima s periferije putem aferentnih živčanih vlakana odlaze u središnji živčani sustav, a odande informacija o pokretu koji slijedi eferentnim vlaknima dolazi u mišić. Ako se radi o refleksnom pokretu, tek nakon što je pokret izvršen, informacija o učinjenome dolazi u mozak. U međuvremenu, signal je aferentnim vlaknima dospio u leđnu moždinu, odakle se vratio na periferiju. Ako se pokret planira bez prethodnog mehaničkog podražaja na periferiji, to se odvija u motoričkoj regiji frontalne kore mozga, odakle informacija odlazi do leđne moždine. Naposljetku, α -motorički neuroni tvore sinapsu s mišićnim vlaknima putem kojih će se obaviti pokret. Masa mišića u fiziološkim uvjetima ovisi o ravnoteži između sinteze i razgradnje proteina, a veličina o ukupnom broju mišićnih vlakana. Funkcija mišića za organizam jest upravo pretvorba kemijske u mehaničku energiju čime je osigurano držanje tijela te pokretanje. U kontekstu održavanja bazalnog metabolizma, oni služe kao izvor supstrata za generiranje topline (poput ugljikohidrata i aminokiselina),

međutim, kada se o radi o skeletnim mišićima, u periodu aktivnosti to su organi koji su najveći potrošači izvora energije te kisika, zajedno s mozgom. Prema mikroskopskoj građi razlikuju se poprečno-prugasti i glatki mišići, a prema stupnju kontrole voljni i nevoljni. Somatski živčani sustav upravlja radom skeletnih (poprečno-prugastih) mišića, dok su unutarnji organi koje čine glatki mišići pod utjecajem autonomnog živčanog sustava (Frontera i Ochala, 2014).

Dio mišića koji se po strukturi i funkciji izdvajaju jesu mišićna vretena. Tvore ih proprioceptori, odnosno, mehanoreceptori koji registriraju promjene duljine mišića (prilikom fleksije i ekstenzije). Mehanoreceptore čine aksonalni nastavci omotani oko mišićnih vlakana. Njihova intrafuzalna vlakna (vretenastog oblika) paralelna su s ektrafuzalnim vlaknima koja pri kontrakciji proizvode silu. Kontrakcija intrafuzalnih vlakana nedovoljna je za doprinos stvaranju vanjske sile, ali pak, s druge strane, dovoljna kako bi aktivirala mehanoreceptore. Za razliku od mehanoreceptora somatosenzoričkog sustava, u mišićnim vretenima karakteristična je prisutnost motoričke inervacije putem γ -motoričkih neurona, takozvanih fuzimotornih vlakana. Pritom primarna (Ia; promjera 12-20 μm) i sekundarna aferentna vlakna (II; promjera 4-12 μm) moduliraju signal o pokretu koji s periferije odlazi u središnji živčani sustav. Svako vreteno ima jedno pripadajuće primarno aferentno vlakno, te do pet sekundarnih. Završeci vlakana u obliku su spirala te, u slučaju primarnih vlakana, svaka spirala inervira područje jednog mišićnog vlakanca u području ekvatora vretena, dok sekundarna vlakna inerviraju područje polova vretena (po jedno mišićno vlakno) koje ima znatno manji stupanj kontrakcije od ekvatorijalnog (**Slika 6.**). Primarna senzorička vlakna prenose informaciju o duljini mišića, odnosno, do okidanja akcijskog potencijala dolazi kontinuirano, dok se sekundarnim vlaknima prenosi informacija o brzini kontrakcije, što je potaknuto njegovim rastezanjem i skraćivanjem. U tom smislu, što se brže dogodila kontrakcija, okidanje akcijskog potencijala bit će intenzivnije. Za razliku od vlakana inerviranih α -motoričkim neuronima, unutar vretena histološki se razlikuju dva tipa intrafuzalnih vlakana: vrećasta (većeg promjera te dulja) i lančasta vlakna (manjeg promjera te kraća). Također, brzina kontrakcije vrećastih vlakna je manja nego li ona u lančastih vlakana (Macefield i Knellwolf, 2018). Sami γ -motorički neuroni dijele se na dinamičke i statičke. Dinamička vlakna aktivna su prilikom kontrakcije ili rastezanja mišića, a statička vlakna prilikom održavanja duljine mišića konstantnom. U mišićnim vretenima prisutna je i nekolicina β -motoričkih neurona koji inerviraju i intrafuzalna i ektrafuzalna vlakna te se također dijele na dinamička i statička (Manuel i Zytnicki, 2011).



Slika 6. Odnos između intrafuzalnih vlakana i aferentnih (senzoričkih) vlakana u središnjem dijelu mišićnog vretena; slika je preuzeta i prilagođena iz Macefield, V. G., i Knellwolf, T. P. (2018). Functional properties of human muscle spindles. *Journal of neurophysiology*, 120(2), 452-467.

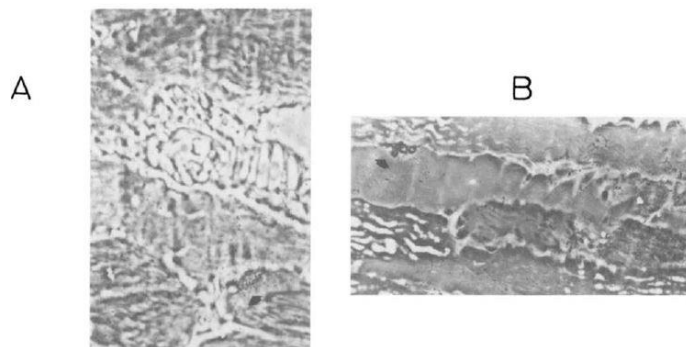
1.3. Mehanizam djelovanja BoNT

Ingestijom BoNT, kako je rečeno, dolazi do transporta gastrointestinalnim sustavom te posljedičnog prelaska nekolicine molekula (koje nisu razgrađene želučanom kiselinom i probavnim enzimima) u krvotok preko epitelnih stanica crijeva i endotela kapilara procesom transcitoze. Taj proces se odvija i u slučaju inhalacije toksina preko epitela plućnih alveola (Matak i Lacković, 2014). Proces specifičnog vezanja na aksonske završetke objašnjen je modelom dvostrukog akceptora, pri čemu se teški lanac preko karboksilnog kraja dvjema domenama veže za komponente presinaptičke membrane – polisijalogangliozide te proteine sinaptičke vezikule tipa 2 (SV2, engl. *Synaptic vesicle proteins 2*). S tim u skladu, specifično vezanje za SV2 pokazatelj je međuovisnosti aktivnosti neurona i ulaska BoNT/A u njihove živčane završetke. Prve interakcije BoNT/A s membranom neurona posredovane su gangliozidima, a nakon postizanja stabilnosti vezanja, dolazi do endocitoze BoNT potaknute vezanjem na N-glikane SV2, poglavito podtipa C (SV2C) te receptore faktora rasta fibroblasta tipa 3 (FGFR3, engl. *Fibroblast growth factor receptor 3*), čime toksin ulazi u odjeljke stanice nalik endosomima - kisele sinaptičke vezikule. Pri pH između 4,5 i 6 te uz utrošak energije dolazi do translokacije lakog lanca u citosol, pri čemu amino-kraj teškog lanca formira poru u membrani vezikule transmembranskim zavojnicama. Potencijal redoks-reakcija, s obzirom na pH, veći je u citosolu, nego u lumenu organela, te sustav enzima tioredoksin-reduktaze reducira disulfidnu vezu između teškog i lakog lanca. Laki lanac u citosolu tada počinje samostalno djelovati kao metaloproteinaza, pri čemu se specifičnost za proteine SNARE kompleksa (u slučaju BoNT/A, SNAP-25) temelji na brojnim protein-protein interakcijama veznih mjesta i regije cijepanja (na razini aminokiselina) (Pirazzini i sur., 2017). Međutim, poznato je kako nekolicina molekula BoNT ne prolazi translokaciju lakog lanca, već iz kiselih vezikula prelaze u

one višeg pH i zatim podliježu procesu retrogradnog aksonalnog transporta posredovanog mikrotubulima (Wang i sur., 2015).

Karakteristično u građi SNARE proteina jesu motivi - homologne regije u obliku zavojnica koje čini 60-ak aminokiselina. Djelovanje svih serotipova BoNT podrazumijeva cijepanje na nekom od mjesta unutar motiva nekog od SNARE proteina. Primjerice, BoNT/E i BoNT/A cijepaju motive SNAP-25, međutim – na različitim mjestima, čime nastaju dva krnja oblika različitih duljina (Bajohrs i sur., 2004). Tako proteolizom izazvanom BoNT/E (cijepa SNAP-25) ili BoNT/B (cijepa VAMP2) struktura proteina narušena je tako da ne može nastati uobičajeni heterotrimer, pa se takvi krnji proteini brzo uklone iz citoplazme. No, to kod djelovanja BoNT/A nije slučaj. Promijenjena duljina SNAP ne ometa formiranje heterotrimer, te se pokazalo da takvi heterotrimeri mogu dulje vremena ostati u aktivnom mjestu otpuštanja vezikula. To je od značaja zato što je time objašnjen nesrazmjer između pocijepanih molekula SNAP-25 te inhibicije lučenja neurotransmitera (Matak i sur., 2019). Međutim, djelovanje BoNT/A zasniva se na potpunoj blokadi lučenja neurotransmitera, a to je stoga što je cijepanje samo 2-20% ukupnog broja SNAP-25 u sinapsi potrebno da bi došlo do blokade otpuštanja vezikula i zasićenja presinaptičke membrane vezikulama (Keller i Neale, 2001). Dakle, i proteoliza relativno malog broja SNAP-25 osigurat će vidljive učinke BoNT/A (Matak i sur., 2019).

Kako bi se razjasnio put BoNT/A nakon intramuskularne injekcije, 70-ih i 80-ih godina prethodnoga stoljeća pri injekciji subletalne doze koristio se radioizotop joda ^{125}I . Pod pretpostavkom da BoNT/A i toksin tetanusa (TeNT, engl. *Tetanus toxin*) dijele put prijenosa živčanim sustavom, Habermann je prvi 1974. godine, korištenjem mikroskopske autoradiografije, dokazao prisustvo ^{125}I -BoNT-A u leđnoj moždini nakon unilateralne intramuskularne injekcije u *m. gastrocnemius* štakora (Habermann, 1974). U daljnjim istraživanjima, BoNT-A se aplicirao unilateralno u *m. gastrocnemius* mačke koja je tada bila osnovni model za proučavanje fiziologije toplokrvnih organizama. Nakon 48 sati, prisutnost ^{125}I -BoNT-A bila je uočljiva ipsilateralno u *n. ischiadicus* te u intraaksonalnom prostoru ventralnih rogova leđne moždine (veća koncentracija bila je u onoj polovici segmenta koja inervira tretirani mišić). Time je još jednom pokazano kako se BoNT-A aksonalnim transportom prenosi na mjesta udaljena od područja injekcije (Wiegand i sur., 1976). Nadalje, intraperitonealnom injekcijom u miša (nakon čega je nastupilo uginuće) praćena je lokalizacija ^{125}I -BoNT-A u NMJ, čime su identificirana vezna mjesta (**Slika 7.**). Također, vizualizacijom radioaktivnog kompleksa praćen je učinak na lučenje acetilkolina (blokiranje egzocitoze vezikula) iz sinaptosoma mozga štakora (Dolly i sur., 1982). Osim toga, potvrđeno je kako se akceptorske molekule za BoNT/A nalaze na membrani aksonskih završetaka motoričkih neurona te da posreduju u unosu BoNT u neurone, zbog čega je velik broj radioaktivno obilježenih molekula bio vidljiv na membrani neurona (Dolly i sur., 1984).



Iako je istraživanjima pomoću radioaktivnog izotopa joda pokazan aksonalni transport BoNT-A, nije bilo poznato zadržava li toksin, naposljetku, enzimatsku aktivnost te je time fokus ostao na djelovanju ograničenom na područje injekcije. Međutim, Antonucci i suradnici 2008. godine detekcijom pocijepanog SNAP-25 u regijama CNS koje šalju svoje projekcije u tretirano područje (također u CNS), dokazuju aktivnost BoNT i nakon aksonalnog - retrogradnog transporta. Primjerice, tri dana nakon injekcije BoNT-A u gornji kolikul tektuma, pocijepani SNAP-25 uočen je u kontralateralnoj mrežnici te ipsilateralno u primarnoj vidnoj kori, što objašnjava razlog „produljenog“ učinka (iako broj pocijepanih SNAP u mjestu injekcije brzo opada). Dodatno, fragmenata SNAP-25 nije bilo u područjima nepovezanim s mjestom injekcije, što će reći da BoNT-A ne difundira pasivno u okolna tkiva (Antonucci i sur., 2008), a isto je prethodno pokazano i za perifernu aplikaciju (Eleopra i sur., 2004). Također, injekcijom BoNT-A u mrežnicu, a lokalizacijom pocijepanih SNAP u gornjem kolikulu tektuma, dokazan je i anterogradni transport aksonima (Restani i sur., 2011). Kako bi se pratio transport perifernim neuronima, BoNT-A injicirao se direktno u živac (*n. ischiadicus*). Za izazivanje inhibicije aksonalnog transporta, proksimalno od mjesta injiciranja BoNT-A dodavao se kolhicin (Matak i sur. 2012; Bach-Rojecky i Lacković 2009). Naime, iz činjenice da kolhicin dovodi do depolimerizacije mikrotubula proizlazi da je aksonalni transport BoNT posredovan upravo mikrotubulima. Također, kako se BoNT/A istraživao i u kontekstu umanjivanja boli (poglavlje 1.4.) izazvane tvarima poput formalina, karagenana ili kapsaicina (injekcijom u *m. gastrocnemius* ili jastučić šape štakora), pokazano je njegovo bilateralno djelovanje nakon unilateralne injekcije (Bach-Rojecky i Lacković, 2005), a naknadno je izazivanjem trigeminalne neuropatije pokazano kako se ono temelji na aksonalnom transportu senzoričkim neuronima (Matak i sur., 2011).

Proces neuroparalize koju uzrokuje BoNT jest u potpunosti reverzibilan, što je osnova opetovanih aplikacija u terapijama pomoću BoNT-A i BoNT-B jer funkcija NMJ nije trajno narušena. Međutim, iako s vremenom dolazi do oporavka postojećih NMJ, nije jasno događa li se oporavak zbog uspostavljanja novih NMJ (Jankovic, 2004). Vrijeme trajanja izazvane paralize ovisi o serotipu BoNT, dozi, vrsti jedinice, načinu aplikacije i tipu živčanih završetaka, a najdulji učinak kod miševa i ljudi

pokazao je upravo serotip A. Kako bi se izbjegla imunizacija (za koju je rizik veći aplikacijom u neposrednoj blizini velike gustoće limfnih čvorova), a ostvario dugotrajni učinak terapije, višekratno se apliciraju minimalne efektivne doze. Međutim, u nekim slučajevima kratkotrajni, ali opsežan učinak može biti poželjniji, pa se intenzivno istražuju afinitet i specifičnost pri interakcijama BoNT unutar NMJ, ali i mehanizam dugotrajnog djelovanja (Pirazzini i sur., 2017). Naime, proteaza BoNT/A dulje vrijeme (*in vitro* do godine dana, *in vivo* do pet mjeseci) ne biva razgrađena staničnim ubikvitin-proteosomalnim sustavom, za što postoje dva potencijalna objašnjenja. Jedno od njih je regrutiranje enzima koji razgrađuju poliubikvitinske lance, a drugo da je BoNT/A zaštićen od razgradnje zbog interakcije sa septinima – malim enzimima koji razgrađuju gvanozin-5'-trifosfat (GTP, engl. *Guanosine-5'-triphosphate*), a koji polimerizirajući u filamente tvore citoskelet stanice (Matak i sur., 2019). Razina biološke aktivnosti toksina te učinak kroz vrijeme mogu se pratiti mjerenjem kombiniranog ili zbrojnog akcijskog potencijala mišića (CMAP, engl. *Compound muscle action potential*) koji se koristi u dijagnostici različitih poremećaja živčane funkcije. Potencijal nastao mišićnom kontrakcijom kao posljedica stimulacije elektrodama pritom se mjeri elektrodama za snimanje signala te amplificira. Povećanjem aktivnosti toksina amplituda CMAP se smanjuje, a elektromiografijom omogućeno je kvantificiranje trenutne aktivnosti BoNT (Sakamoto i sur., 2009).

1.4. Poznati učinci i primjena BoNT

Justinus Kerner bio je njemački pjesnik i liječnik koji je, potaknut smrtonosnim trovanjem dimljenom mesnom hranom stanovnika njemačke pokrajine Württemberg, 1821. godine prvi počeo detaljnije istraživati uzroke obolijevanja. Rezultat njegovih eksperimenata na životinjama, ali i promatranja oboljelih pacijenata kroz dvije godine bili su po prvi puta dostupni opisani simptomi, etiologija i patofiziologija botulizma te preporuke za prevenciju i liječenje. Sve podatke objavio je u monografijama „*Sausage Poison*“ gdje na jednostavan način opisuje kako se unatoč prekidu provođenja perifernog i autonomnog živčanog signala, senzoričko provođenje signala zadržava. Također, iz Kernerovih monografija može se iščitati i zaključak o potencijalu korištenja BoNT u terapijske svrhe. Pretpostavka je bila da će primjena BoNT u minimalnim dozama smanjiti ili ukloniti hiperekscitabilnost, kao i hiperaktivnost somatskog i autonomnog živčanog sustava (Erbguth, 2004).

Do danas, učinak BoNT isproban je kod brojnih poremećaja poput poremećaja pokreta, hipersekrecije, osjeta boli, gastrointestinalnih poremećaja, poremećaja zdjeličnog dna, tetanusa, ali i za perioperativne fiksacije u ortopedskim operacijama (Dressler i sur., 2005). Prva klinička primjena BoNT bila je 1980. u tretiranju strabizma kada je kao alternativu operaciji Alan B. Scott (1980) ponudio injekciju serotipa A u ekstraokularne mišiće. Pokazano je i kako kod lakših slučajeva jednokratna aplikacija može osigurati trajno poravnanje optičke osi. Nadalje, jedna od čestih primjena ovog toksina

u oftalmologiji jest u indukciji zaštitne ptoze kapaka, što je uobičajeni postupak za olakšavanje cijeljenja rožnice u slučaju infekcije, upravo jer se tako izbjegava šivanje, a time i oštećenje osjetljivih rubova kapaka. Međutim, BoNT-A se velikoj mjeri koristi u tretiranju fokalnih distonija koje su obilježene trajnim nevoljnim kontrakcijama mišića ograničenog dijela tijela pri čemu dolazi do opetovanih pokreta, izvijanja tijela kojim se ono dovodi u neprirodan položaj, te izazivanja boli. Primjeri takvih distonija su blefarospazam (zatvaranje kapaka uslijed distonije periokularnih mišića) i cervikalna distonija (distonija mišića vrata i ramenog obruča, zbog čega izostaje kontrola držanja glave u željenom položaju). U okviru sindroma Parkinsonove bolesti zastupljenost distonija iznosi približno 50%. Osim distonija, pomoću BoNT-A se kod Parkinsonove bolesti tretiraju i tremor, slinjenje i inkontinencija (injekcijom u mokraćni mjehur). Naime, potreba za alternativnom terapijom pojavila se uslijed nedovoljne učinkovitosti u liječenju, ali i štetnim učincima konvencionalne terapije koja, uz vježbe, podrazumijeva oralne lijekove i kirurške postupke poput denervacije i mijektomije. Ako je distonija opsežnija (zahvaća šire područje tijela) ili terapija BoNT ne pokazuje rezultate, tada se i dubokom stimulacijom mozga može postići određeni terapijski uspjeh. Aplikacija BoNT-A uobičajena je i kod spastičnosti tipične za bolesna stanja poput moždanog udara (s učestalošću 30%), multiple skleroze i trauma središnjeg živčanog sustava, primjerice cerebralne paralize. Jedan od primjera diskinezije jest hemifacijalni spazam (sinkrone unilateralne distonije mišića inerviranih facijalnim živcem do čega dolazi uslijed dugotrajnog neurovaskularnog kontakta). U široj primjeni, BoNT-A se kao terapeutik koristi u tretiranju ahalazije (poremećena peristaltika i opuštanje donjeg sfinktera jednjaka), tikova, hipersalivacije (pretjerano slinjenje), hiperhidroze (pretjerano znojenje) te idiopatske ili neurogene pretjerane aktivnosti mokraćnog mjehura (mokrenje u odsustvu patoloških procesa ili dovoljne količine mokraće za poticanje mokrenja). Također, kao kozmetički pripravak, ovaj se neurotoksin koristi u estetskoj medicini (Dressler, 2012).

Djelovanje TeNT, kao i BoNT, prepoznato je u inhibiciji fuzije vezikula neurotransmitera, pri čemu cijepanjem VAMP dolazi do spastične paralize. Međutim, TeNT ostvaruje djelovanje tek nakon retrogradnog aksonalnog transporta iz motoričkog neurona u leđnu moždinu, gdje djeluje na inhibitorne interneurone. Oba toksina građena su od teškog i lakog lanca te se djelovanje temelji na endopeptidazi ovisnoj o cinku (Pellizzari i sur., 1999). Poznato je da kod lokalnog spazma izazvanog primjenom TeNT u *m. gastrocnemius*, naknadna primjena BoNT-A u *m. gastrocnemius* ili *n. ischiadicus* izaziva postupno smanjenje vidljivih znakova spastične paralize, uz razvoj flacidne paralize kod davanja u mišić (Matak, 2020;).

Osim navedenog, BoNT/A pokazuje djelovanje na senzorički sustav, čime je prepoznat potencijal za analgetske učinke. S obzirom na do tada široku upotrebu BoNT kod poremećaja pokreta, pa tako i cervikalne distonije, 1986. otkriven je učinak umanjivanja boli. Međutim, isprva se smatralo kako je analgezija (odsustvo osjećaja boli ili neosjetljivost na bol) izravni rezultat smanjenja mišićne kontrakcije, što je bila posljedica intramuskularne injekcije BoNT (Tsui i sur., 1986). Naknadnim

istraživanjima pokazano je da BoNT pokazuje zasebne antispastične i analgetske efekte, koji se razlikuju u brzini nastanka i trajanju nakon primjene toksina (analgetski učinak brže nastupa i traje duže od antispastičnog) (Freund i Schwartz, 2003). Kronična migrena je zasad jedina indikacija za liječenje boli pomoću BoNT-A. Razlog tome jest primijećen učinak olakšavanja boli u pacijenata koji su bolovali od migrene, a koristili su BoNT u kozmetičke svrhe, odnosno, za smanjenje facijalnih bora. Istraživanja su pokazala kako BoNT/A ima djelotvoran učinak u olakšavanju boli kod kronične migrene (koja, za razliku od epizodične, traje barem 15 dana) te ga je 2010. godine Agencija za hranu i lijekove odobrila kao analgetik u njezinu liječenju, a u te svrhe se koristi i danas (Diener i sur., 2010).

Općenito, nekoliko je karakteristika BoNT koje ga izdvajaju od ostalih analgetika. Za početak, učinak analgezije dugotrajan je – u eksperimentalnih životinja do tri tjedna, a u ljudi do tri mjeseca. Nadalje, BoNT ne utječe na percepciju akutnog bolnog podražaja, već modulira stanja hiperekscitabilnosti koja uključuju centralnu senzitivaciju, odnosno, prekomjernu podražljivost spinalnih i supraspinalnih neurona i lučenje ekscitacijskih neurotransmitera, a time je očuvana upozoravajuća funkcija boli za organizam. Osim toga, minimalna doza od 3.5 U/kg koja će izazvati analgeziju u štakora pokazuje jednaki učinak kao i doze veće od nje, ali nužno manje od 30 U/kg, koja će izazvati slabljenje mišića uslijed sistemske distribucije toksina. Kod primjene visokih, sistemskih doza BoNT-A koje mogu utjecati na motoriku eksperimentalnih životinja, može doći do krive interpretacije rezultata ako se analgetski učinak mjeri motoričkim odgovorom na bolni podražaj (Bach-Rojecky i sur., 2005). BoNT pokazuje učinak na neuropatsku bol koja nastaje oštećenjem perifernih živaca, korijena živaca ili središnjeg živčanog sustava. Također, dosad nisu objavljeni negativni učinci BoNT kao sredstva za moduliranje kronične boli, hiperalgezije (osjet bolnog podražaja neproporcionalno je veći od jačine podražaja) i alodinije (javljanje osjeta boli bez potencijalno bolnoga podražaja) (Lacković, 2020).

Na početku senzoričkog puta procesom transdukcije, na razini receptora, dolazi do pretvorbe energije podražaja u živčani impuls koji se prenosi senzoričkim živčanim vlaknima. Međutim, u tom koraku puta prijenosa signala o boli dolazi do periferne senzitivacije, odnosno, povećane osjetljivosti nociceptora na podražaj, što je uzrokovano otpuštanjem upalnih medijatora poput prostaglandina, histamina, bradikinina te dušikovog monoksida. Periferna senzitivacija uzrokuje pretjeranu ekscitaciju prvog reda neurona, što prouzrokuje povišenje koncentracije upalnih molekula u središnjem živčanom sustavu (leđnoj moždini), prvenstveno tvari P te peptida povezanog s genom za kalcitonin (CGRP, engl. *Calcitonine gene-related peptide*), čija egzocitoza je regulirana razinom kalcija (Dolly i O'Connell, 2012). Time u transmisiji dolazi do pretjerane ekscitacije neurona drugoga reda čiji aksoni tvore sinapse s neuronima trećega reda u talamusu, odakle se projekcije o boli prenose u moždanu koru (Yam i sur., 2018). Također, posljedično se povećava i osjetljivost receptora za tvar P – vaniloidnog kationskog kanala prolaznog potencijala tipa 1 (TRPV1, engl. *Transient receptor potential vanilloid type 1*) te neurokininskog receptora tipa 1 (NK-1, engl. *Neurokinin-1*), zbog čega opisani spinotalamički put

ostaje trajno, ali i pojačano aktivan u usporedbi s fiziološkim uvjetima, a osjećaj boli pojačan je (Kim i sur., 2012). Naposljetku, Dolly i O'Connel opisali su interferenciju BoNT/A s opisanim putem boli, s naglaskom na periferni učinak. Međutim, Bach-Rojecky i Lacković (2009) predložili su kako je antinociceptivni učinak BoNT-A primarno, ako ne i isključivo središnji, a prethodno je pokazano i da BoNT-A može smanjiti bol bez perifernog djelovanja na upalu, odnosno, na lučenje neurotransmitera te medijatora upale (Bach-Rojecky i sur., 2008). Ako se BoNT-A injicira u živac daleko od perifernih sinapsi, djeluje na bol izazvanu formalinom i u mnogo manjim dozama od doza koje pokazuju učinak periferno (0.5 U/kg u odnosu na 3.5 U/kg). Također, u proučavanju bilateralnih modela boli, BoNT/A primijenjen u jednu šapicu smanjuje bol i na drugoj šapici, što potpuno isključuje periferne učinke. Osim toga, djelovanje na bol u potpunosti ovisi o aksonalnom transportu jer se njegovo djelovanje u potpunosti blokira ako se kolhicinom ili transekcijom živca spriječi aksonalni transport kroz mišić ili ganglij (Bach-Rojecky i Lacković, 2009). Konkretno, djelovanje toksina vezano je uz završetke TRPV1-pozitivnih neurona u dorzalnom rogu, a pokazana je interakcija s opioidnim i GABA-iergičnim sustavom u CNS-u (Drinovac i sur., 2014, Drinovac i sur., 2013). Središnji učinci posredovani su anterogradnim i retrogradnim transportom duž aksona neurona koji sudjeluju u putu boli (Matak i Lacković, 2014).

Iako je aktivna tvar ista, na tržištu su dostupne različite jedinice potentnosti i bioaktivnosti (U, engl. *Unit*) BoNT, pri čemu 1 U odgovara letalnoj dozi za 50% miševa (LD₅₀; medijalna letalna doza) Webster soja i mase 20 g, što iznosi 48 pg kompleksa toksina molekulske mase 900 kDa (Matak i sur., 2012). Pritom, letalna doza za čovjeka mase 70 kg iznosi 2500-3000 U, a jednokratnom aplikacijom u velike mišiće preporučeno je unijeti do 400 U (izuzev u estetske svrhe, kada je preporučena doza do 30 U) (Dhaked i sur., 2010). Komercijalno dostupne izvedbe BoNT u Sjedinjenim Američkim Državama i Europi su sljedeće: *Botox*; *Clostridium botulinum toxin type A neurotoxin complex* (EMA, 2003), *Dysport*; *Clostridium botulinum type A toxin-haemagglutinin complex* (WHO, 2021), *Xeomin*; *Clostridium botulinum neurotoxin type A* (EMA, 2008) te *Myobloc*; *Botulinum toxin type B* (EMA, 2021) (Matak i Lacković, 2014). Indikacije za koje je dozvoljeno koristiti *Botox* u terapiji su cervikalna distonija, kronična migrena, teška primarna aksilarna hiperhidroza, strabizam, blefarospazam, neurogeni mokraćni mjehur i spastičnost gornjih ekstremiteta. *Dysport* i *Xeomin* se koriste u liječenju cervikalne distonije, spastičnosti ekstremiteta, ali i, poput kozmetičkog *Botoxa* i *Botoxa*, za tretiranje facijalnih bora. *Xeomin* se također koristi u liječenju blefarospazma te kronične sijaloreje (obilno lučenje sline), a *Myobloc* za cervikalnu distoniju (Medscape, 2019).

Korištenje BoNT-A u liječenju simptoma hiperkinetičkih poremećaja pokazalo je kako njegovo djelovanje vrlo vjerojatno nije ograničeno na NMJ. Primjerice, kod distonije je često uobičajeno poboljšanje kliničke slike bez ili s minimalnim slabljenjem mišića. Korisni učinci prisutni su do nekoliko mjeseci, a tonus i funkcija mišića poboljšavaju se u netretiranim dijelovima tijela, što je osim kod distonije, primijećeno i kod spastičnosti (Weise i sur., 2019). Dakle, poboljšanje u motoričkoj funkciji očito nadilazi periferne učinke, što ujedno ukazuje na središnje učinke BoNT-A koji su posljedica

transcitoze. Osim retrogradnog aksonalnog transporta, još su dva predložena mehanizma za središnje djelovanje ovoga toksina: blokada NMJ γ -motoričkih neurona i intrafuzalnih vlakana, što smanjuje aferentne signale te blokada NMJ α -motoričkih neurona i ektrafuzalnih vlakna (Mazzocchio i Caleo, 2015). Primjer neuralnog kruga na kojem je istraživani središnji efekt BoNT-A jest onaj ponavljajuće inhibicije motoričkih neurona. Naime, neuroni naziva Renshawove stanice inhibiraju motoričke neurone koji ih aktiviraju, a inhibicija motoričkih neurona u s kojima tvore sinapse je snažnija ako su aktivirane supraspinalnim putem. S obzirom na to, smatra se kako modulacija aktivnosti Renshawovih stanica utječe na količinu ekscitacijskih signala, što može imati adaptivnu vrijednost za organizam, u smislu da se pokret događa i pri minimalnoj jačini podražaja, ili pak da je kretnja suzdržana, osim ako nije esencijalna za održanje integriteta jedinke. Konkretno, u istraživanju Marchand-Pouvert i suradnika (2013), mjesec dana nakon periferne aplikacije BoNT-A u *m. soleus* pacijenata s izraženim posljedicama moždanog udara pokazano je smanjenje inhibicije motoričkih neurona *m. vastus lateralis* kvadricepsa, s kojima sinapse tvore Renshawove stanice. Dakako, u podlozi smanjenja inhibicije leže sinapse kolateralnih ogranaka motoričkih neurona *m. soleus* s Renshawovim stanicama.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ovim radom želi se ispitati utječe li središnje djelovanje toksina botulina tipa A na normalnu motoriku u štakora. Kako bi se to postiglo, kroz period od 78 dana pratit će se i uspoređivati periferni i središnji učinci BoNT/A na trajanje i oporavak mlohave paralize, poremećaja motorike hoda i plivanja, te mišićne atrofije. Osim toga, ispitat će se prisustvo središnje enzimske aktivnosti toksina.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Eksperimentalne životinje

Eksperimentom je, za potrebe izrade diplomskog rada, obuhvaćeno 34 mužjaka štakora soja Wistar u starosti od pet mjeseci te tjelesne mase 300-500 grama. Štakori su uzgojeni na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu uz uvjete održavanja konstantne temperature i vlažnosti zraka te ciklusa noć-dan automatskim paljenjem i gašenjem svjetla svakih 12 sati u nastambi, a isti uvjeti nastavili su se održavati do kraja eksperimenta. Unutar jednog kaveza bivale su smještene dvije do tri jedinke s pristupom vodi i hrani *ad libitum*. Aklimatizacija i bihevioralna mjerenja odvijali su se uvijek u istoj prostoriji te u isto doba dana. Kako bi se pratilo njihovo opće stanje, štakori su se jednom tjedno vagali kako bi se pratilo normalno dobivanje tjelesne mase, a na dnevnoj osnovi je praćeno stanje životinja, poput vanjskog izgleda životinje (npr. izgled dlake, moguće prisustvo porfirinskih naslaga oko nosa i očiju), reakcije na prisustvo eksperimentatora, aktivnost unutar kaveza itd. Prilikom planiranja i izvedbe svih eksperimentalnih koraka poštivalo se načelo 3R – „*replacement, reduction, refinement*“, odnosno, zamjena korištenja životinja alternativnim metodama koje bi dale jednako pouzdane rezultate, smanjenje broja korištenih životinja na minimalni broj koji bi dao statistički značajne podatke te poboljšanje uvjeta eksperimenta, konkretno, korištenjem kartonskih tunela za obogaćivanje okoliša (Russel i Burch, 1959). Nadalje, poštivan je Zakon o zaštiti životinja (NN 102/17) koji je donio Hrvatski sabor, kao i pripadajući mu Pravilnik o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13 s izmjenama 39/17 i 116/19) sastavljen prema Direktivi Europske unije 2010/63/EU. Pokus je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (ur. broj 525-10/0543-20-4, klasa UP/I-322-01/19-01/73).

3.2. Eksperimentalne tvari

3.2.1. BoNT/A

Komercijalni pripravak BoNT/A (BOTOX[®], Allergan, Inc., Irvine, CA, SAD) koji sadrži 100 U (U - standardna internacionalna jedinica gdje 1U odgovara LD₅₀ u miševa), otopila sam u fiziološkoj otopini do koncentracije 1U/μl te u alikvotima pohranila na -20°C. Prije tretiranja štakora, toksin sam pustila da se otopi na sobnoj temperaturi te, ovisno o mjestu aplikacije, razrijedila do odgovarajuće koncentracije fiziološkom otopinom.

3.2.2. Antitoksin

BoNT-A-neutralizirajući pripravak antitoksina (poliklonski IgG iz konja, *National Institute for Biological Standards and Control*, Potters Bar, UK), primijenjen u dozi od 5 internacionalnih jedinica (i.u.; količina antitoksina koja može blokirati 10 000 LD₅₀ BoNT/A) otopila sam u fiziološkoj otopini do koncentracije 1 i.u./ μ l te u alikvotima pohranila na -20°C. Prije tretiranja štakora, antitoksin sam otopila na sobnoj temperaturi.

3.2.3. Normalni konjski serum

Komercijalni pripravak (Gibco, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) otopila sam u fiziološkoj otopini te ga je mentor injicirao u ekvivalentnom volumenu kao i antitoksin.

3.2.4. Fiziološka otopina

Fiziološku otopinu spravljala sam dodavanjem 9 g soli u 1000 ml destilirane vode. Proces otapanja ubrzala sam miješanjem na magnetskoj miješalici sve dok kristali soli nisu prestali biti vidljivi golim okom. Dobivenu otopinu sam začepila staklenim čepom te ostavila na sobnoj temperaturi.

3.2.5. Ostale tvari

Za eksperimentalne postupke koji su se provodili na anestetiziranim jedinkama, koristila sam 70%-tni etanol (za sterilizaciju), anestetik ketamin (Richter Pharma AG, Wels, Austrija) koncentracije 100 mg/ml te analgetik ksilazin (Alfasan, Woerder, Nizozemska) koncentracije 20 mg/ml. Za potrebe inhalacijske anestezije koristila sam izofluran (Piramal Enterprises Limited, Andra Pradesh, Indija). Za potrebe šivanja rana mentor je koristio neresorptivni kirurški konac (Mersilk 5-0, Ethicon, Livingstone, UK). Pri obradi tkiva nakon žrtvovanja koristila sam: fiziološku otopinu, 30%-tnu fosfatom puferiranu otopinu (PBS, engl. *Phosphate-buffered saline*), 4%-tni paraformaldehid (puferirani fiksativ), 15%-tnu i 30%-tnu otopinu saharoze, antifriz (30%-tni etilen-glikol i 20%-tni glicerol u PBS), 3%-tni vodikov peroksid (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD), 10%-tni normalni kozji serum (NGS, engl. *Normal goat serum*), primarna poliklonalna protutijela iz kože koja specifično vežu ChAT (Sigma-Aldrich, Dublin, Irska), sekundarna fluorescentna protutijela iz kože Alexa 555 (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD), primarna poliklonalna protutijela iz kunića koja specifično vežu pocijepane SNAP-25 (*National Institute for Biological Standards and Control*, Potters Bar, UK), sekundarna protutijela konjugirana s peroksidazom hrena (HRP, engl. *Horseradish peroxidase*) (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD), tiramid vezan uz fluorofor Atto 488 (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD), Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), sredstvo za uklapanje uzoraka za rezanje na kriostatu (Tissue-Tek O.C.T. Compound,

Sakura Finetek, Japan) i tvar za sprječavanje blijedenja (FluoroGel, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, SAD).

3.3. Eksperimentalni postupci

Sve eksperimentalne postupke provodili smo naizmjenično (izmijenjujući se na zadacima po danima), te samostalno ili u paru, mentor Ivica, doktorandica Petra i ja te smo uvijek svi bili prisutni. Kroz tri tjedna prije izvođenja pokusa, provođenjem bihevioralnih testova koji su bili dio pokusa, štakore smo prilagodili na novu okolinu te rutinu obavljanja zadataka bez zadržki ili istraživanja okoline, čime se ubuduće promjena u rezultatima mogla pripisivati motoričkim sposobnostima koje su se zbog prirode pokusa mijenjale. Bihevioralne testove čiji su rezultati uključeni u istraživanje, ovisno o trajanju mjerenja i vremenu nakon operacije, provodila sam neposredno prije tretmana BoNT-A (dan 0) 1. dan, 2. dan, 3. dan, 5. dan, 7. dan, a zatim svakih sedam dana sve do 56. dana nakon operacije (istoga dana; u isto vrijeme), počevši od prvog tretmana životinja (i.m. i i.n. injekcija BoNT-A). Sve životinje žrtvovala sam, uz mentora i doktorandicu, do 78. dana pokusa. Nakon što sam obradila izolirano tkivo, na uzorcima leđne moždine promatrala sam pocijepane SNAP-25 leđne moždine fluorescencijskim mikroskopom te statistički obradila sve dobivene podatke.

3.3.1. Eksperimentalni dizajn

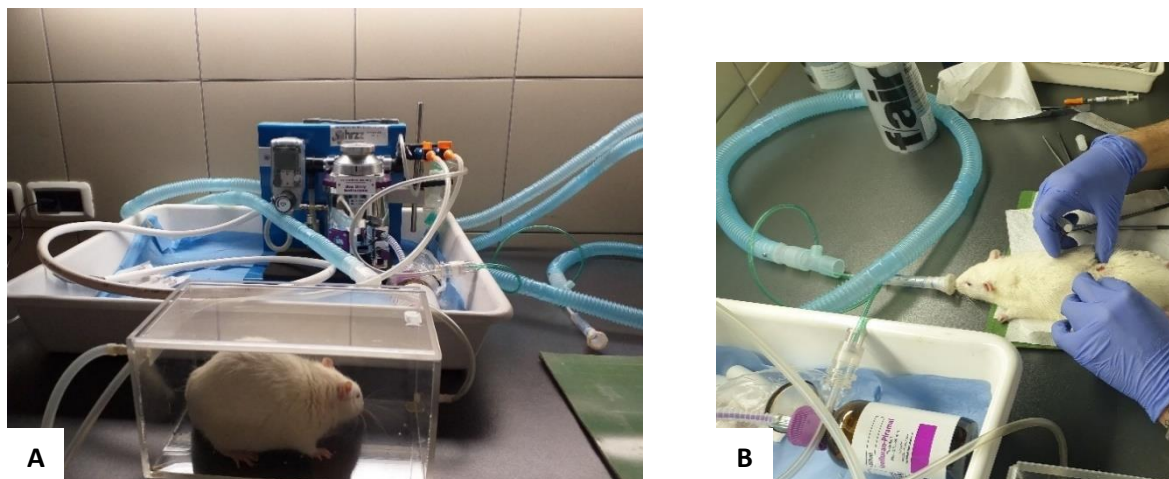
Postupkom randomizacije, doktorandica je životinje podijelila u pet eksperimentalnih grupa, od kojih je svaku činila skupina od pet do osam štakora. Intraneuralne i intramuskularne aplikacije bile su obuhvaćene zahvatima koje je provodio mentor u istom danu, dok je intratekalno injiciranje antitoksina ili konjskog seruma mentor izveo nakon 24 sata - na osnovi prijašnjih pokusa na štakorima gdje je pokazano sprječavanje transcitoze i pojavnost pocijepanog SNAP-25 u facijalnoj jezgri i leđnoj moždini, što upućuje na prelazak toksina iz primarnih motoričkih neurona u sekundarne sinapse u vremenu nakon 24 h (za miša je to nakon tri do šest sati) (Matak, 2020; Caleo i sur., 2018). Prvoj je skupini mentor injicirao fiziološku otopinu i.m. i i.n., a i.t. konjski serum (HS, engl. *Horse serum*) – u rezultatima skraćeno k.s., što ju čini kontrolnom skupinom. Drugoj skupini injicirao je i.m. BoNT-A, i.n. fiziološku otopinu, a i.t. konjski serum. Trećoj skupini injicirao je i.m. BoNT-A, i.n. fiziološku otopinu, a i.t. antitoksin (ATX, engl. *Antitoxin*). Četvrtoj skupini injicirao je i.m. fiziološku otopinu, i.n. BoNT-A, te i.t. konjski serum. Petoj skupini injicirao je fiziološku otopinu i.m., BoNT-A i.n., a antitoksin i.t. (**Tablica 1.**)

Tablica 1. Eksperimentalne skupine životinja

SKUPINA	TRETMANI	BROJ ŽIVOTINJA
1	fiz. (i.m.) + fiz. (i.n.) + HS (i.t.)	8
2	BoNT (i.m.) + fiz. (i.n.) + HS (i.t.)	5
3	BoNT (i.m.) + fiz. (i.n.) + ATX (i.t.)	5
4	fiz. (i.m.) + BoNT (i.n.) + HS (i.t.)	8
5	fiz. (i.m.) + BoNT (i.n.) + ATX (i.t.)	8

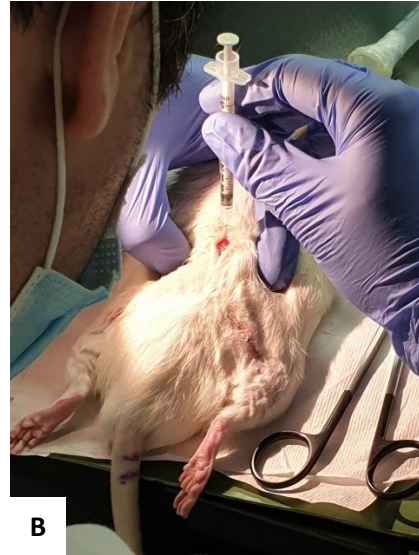
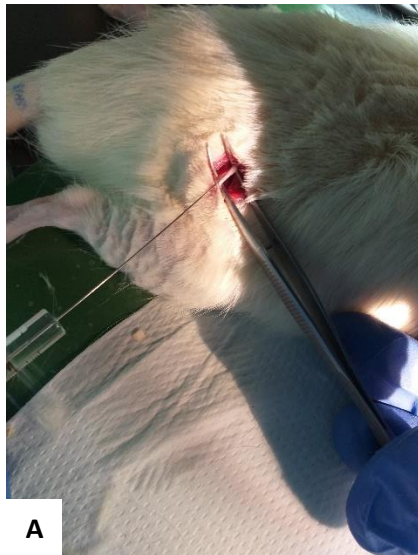
3.3.2. Injiciranje eksperimentalnih tvari

Za potrebe indukcije duboke anestezije, životinjama sam intraperitonealno injicirala, prema preporučenim dozama za štakora, 70 mg/kg ketamina i 7 mg/kg ksilazina. Osim toga, za kratkotrajne postupke (intratekalnu aplikaciju tvari), životinje sam podvrgavala inhalacijskoj anesteziji izofluranom uz dovod kisika, korištenjem isparivača (Ugo Basile, Varese, Italija). Pritom sam za indukciju anestezije, što se odvijalo unutar komorice od pleksiglasa s kliznim poklopcem, koristila maksimalnu propusnost izoflurana - 5 (5%), a za održavanje anestezije, putem inhalacijske tube prislonjene na njušku štakora, jačinu propusnosti 3 (3%). (**Slika 8.**) Uspavanost sam potvrđivala provjerom refleksa šapice prilikom izazivanja bolnog podražaja, npr. štipanjem između prstiju. Zbog ukupnog broja životinja i vremena koje je obavljanje svih operativnih postupaka iziskivalo, eksperimentalne tvari injicirao je mentor: intramuskularno (i.m.) u *m. gastrocnemius*, intraneuralno (i.n.) u *n. ischiadicus* te intratekalno (i.t.) u lumbalno područje leđne moždine. Prije samog postupka, sva mjesta aplikacije tvari ošišala sam i sterilizirala 70%-tnim etanolom. Za i.m. i i.t. injekciju mentor je koristio sterilne 27^{1/2} G (*gauge*) igle, a za i.n. injekciju *hamilton* igle (Hamilton, Bonadouz, Švicarska) dimenzija 0.45mm x 0.16 mm i volumena šprice 10 µl.



Slika 8. Indukcija inhalacijske anestezije u komorici od pleksiglasa (A) i održavanje inhalacijske anestezije pomoću inhalacijske cijevi (B)

Nakon vizualizacije *m. gastrocnemius* dodiranjem, u svaki od mišića, lijevi i desni, mentor je injicirao 0.8 U u 20 μ l otopine BoNT-A ili 20 μ l fiziološke otopine, pri čemu je taj volumen podijelio (2x10 μ l) na dva mjesta ubrizgavanja – lateralni i medijalni trbuh mišića. Za potrebe bilateralne i.n. injekcije BoNT-A ili fiziološke otopine napravio je lateralnu inciziju duljine 1 cm na bedru štakora, a potom tupom disekcijom prikazao *n. ischiadicus* (**Slika 9.**). S obzirom da se radi o malom volumenu, 2 U u 2 μ l otopine za svaki živac, nakon polaganog ispuštanja sadržaja iz igle, mentor je iglu još neko vrijeme mirno zadržavao na mjestu ubrizgavanja. Naposljetku, pažljivo je izvukao iglu iz živca, pustio ga da se vrati u prirodan položaj te zašio ranu. Prilikom i.t. injekcije 10 μ l antitoksina ili konjskog seruma trebalo je identificirati točno mjesto injekcije, što je mentor potvrdio laganim trzajem repa ili stražnjih nogu štakora (područja inerviranog lumbalnim dijelom leđne moždine) (**Slika 9.**). Doze BoNT odredio je na temelju poznatih minimalnih doza koje ne izazivaju sistemski učinak, kao i zahvaljujući prethodnim i preliminarnim eksperimentima (Cui i sur., 2004; Matak, 2020).



Slika 9. Intranuralna (i.n.) (A) i intratekalna (i.t.) aplikacija (B)

3.3.3. Žrtvovanje i obrada tkiva

Životinje sam žrtvovala nakon postizanja duboke anestezije kombinacijom ketamina i ksilazina, što sam potvrđivala manjkom refleksa fleksije šape na kratkotrajni bolni podražaj (pritisak kirurškom pincetom). Nakon podizanja kože pincetom s abdomena, pazeći na zadržavanje integriteta unutarnjih organa, izvela sam bilateralnu inciziju trbušnog zida, od distalnog dijela tijela do područja rebara. Horizontalnim prerezivanjem dijafragme (čime je otvoren ulaz u pleuralnu šupljinu) te bilateralnim prerezom rebara do prsne kosti, nakon podizanja prsnog koša hemostatom (kojim se uhvati prsna kost), vizualizirala sam srce te uklonila okolno vezivno tkivo. Potom sam provela transkardijalnu perfuziju životinje, pri čemu sam 15 G iglu ubola u lijevi ventrikul, odmah uz vrh srca (*apex*) (**Slika 10.**). Naposljetku, napravila sam malu inciziju desnog atrija. Isprva sam štakore perfundirala s 500 ml fiziološke otopine do ispiranja krvi (blijedenja tkiva), a potom 4%-tnim paraformaldehidom dok tkivo nije značajno otvrdnulo. Brzinu istjecanja tekućine pomičnim sam kotačićem namjestila na jednu kapljicu po sekundi. Nakon perfuzije izolirala sam *m. gastrocnemius* i *m. soleus* (radi provjere učinka BoNT-A na atrofiju nakon lokalne primjene u *m. gastrocnemius*). Vodoravni rez napravila sam oko tarzalnog zgloba, a lateralni i medijalni duž potkoljenice, nakon čega sam tupo ispreparirala kožu i potkožno tkivo. Time sam mišićje odvojila od okolnoga tkiva, a potom ga i izolirala. Nakon izolacije, oštrim rezom ispreparirala sam lateralni od medijalnog trbuha *m. gastrocnemius* te uzela lateralni trbuh (radi najveće rasprostranjenosti NMJs u središnjem dijelu mišića). Drugi mišić, *m. soleus*, uzela sam u cijelosti radi znatno manje veličine u odnosu na *m. gastrocnemius*. Kako bih izolirala leđnu moždinu, napravila sam rez duž leđa štakora (od glave prema repu) te tupo ispreparirala kožu i potkožno tkivo duž mišića smještenih iznad leđne moždine. Kaudalno od lopatica prerezala sam leđnu moždinu uz

odvajanje tijela i lukova kralježaka sve do kaude ekvine. Uslijedila je izolacija leđne moždine tako da ju pincetom držim za kranijalni dio te polako odvajam od ventralnog dijela kralježničnog kanala prerezivanjem pripadajućih živaca i ovojnice. Naposljetku, izoliranu leđnu moždinu odvojila sam od živaca. Tkivo sam na 4°C 24 sata ostavila uronjeno u 15%-tnoj otopini saharoze u puferiranom paraformaldehidu, a potom prebacila u 30%-tnu otopinu saharoze u PBS. Nakon što je tkivo potonulo, pohranila sam ga na -80°C. Uzorke leđne moždine doktorandica je namjestila na rezanje na prezeze debljine 35 µm u kriostatu (Leica, Wetzlar, Njemačka) na -25°C nakon što sam uklopila uzorke (pri čemu se u sredstvu za uklapanje nalazi DAPI boja). Rezove sam pohranila u smjesu PBS i glicerola na 4°C, a potom u smjesu PBS-a, glicerola i antifrizu na -20°C.



Slika 10. Transkardijalna perfuzija u štakora

3.4. Eksperimentalne metode

3.4.1. Bihevioralni testovi

Kako bih mjerila parametre mlohave paralize, određivala sam prisutnost refleksa širenja prstiju (DAS, engl. *Digit abduction score*), otpor pri pasivnoj fleksiji tibiotarznog zgloba, te sposobnost hoda i držanja (engl. *gait ability*). Nadalje, za mjerenje parametara koordinacije i izdržljivosti, mjerila sam vrijeme prelaska puta po povišenoj, ravnoj šipci te ukupno vrijeme održavanja na povišenom, rotirajućem valjku. Atrofiju, kao direktnu posljedicu aplikacije BoNT-A, procjenjivala sam mjerenjem promjera lista stražnjih nogu te vaganjem mišića nakon žrtvovanja. Za sve navedeno promatrala sam zasebno lijevu i desnu stražnju nogu, na temelju čega sam izračunala prosjek rezultata prikazan dalje u

tekstu. Naposljetku, testirala sam plivanje štakora u bazenu, prilikom čega sam promatrala maksimalnu i srednju brzinu plivanja.

3.4.1.1. Refleks širenja nožnih prstiju (DAS)

DAS sam određivala tako da je mentor podigao životinju od podloge, prilikom čega ju je postavio u vertikalni položaj i držao oko struka. Pritom sam bodove, za svaku nogu zasebno, dodjeljivala prema semikvantitativnoj skali (Broide i sur., 2013; Aoki, 2001). U tom smislu, nula („0“) je označavala širenje svih prstiju (razdvajanje jednih od drugih), jedan („1“) razdvajanje četiri prsta, dva („2“) razdvajanje tri prsta, tri („3“) razdvajanje dva prsta i četiri („4“) potpuno nerazdvajanje prstiju. Bodove koje sam dodijelila svakoj nozi naposljetku sam koristila za dobivanje srednje vrijednosti za svakog štakora.

3.4.1.2. Otpor pri dorzifleksiji tibiotarznog zgloba

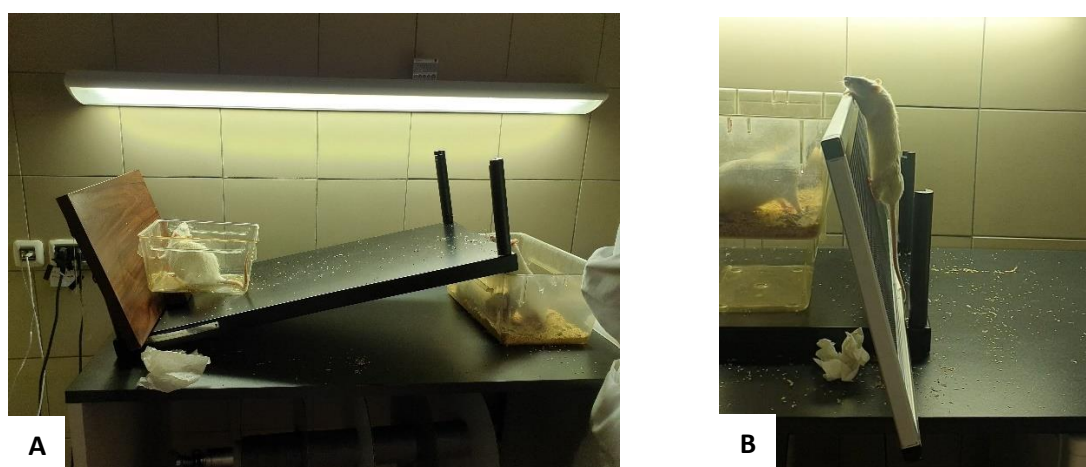
Kako bih mogla mjeriti otpor koji štakor pruža pri pasivnoj fleksiji tibiotarznog zgloba, držeći štakora oko struka u vertikalnom položaju, mentor je izveo dorzifleksiju. Drugim riječima, postavljanjem noge štakora na platformu (1.5 cm x 4 cm x 4 cm) digitalne vage, izvršio je lagani pritisak nogom štakora na platformu (do postizanja kuta tibiotarznog zgloba od 90°), te sam, nakon otpuštanja pritiska na nogu, očitala i bilježila otpor koji ta noga daje u gramima (**Slika 11.**). Postupak smo za svaku nogu izvršili dvaput, nakon čega sam za svaku nogu u obzir uzimala srednja vrijednost.



Slika 11. Mjerenje otpora pri dorzifleksiji tibiotarznog zgloba pomoću digitalne vage

3.4.1.3. Hodanje i držanje (*gait ability*)

Elementi motoričkih aktivnosti koje sam ocjenjivala su: abdukcija stražnjih nogu prilikom podizanja za rep, korištenje i izgled stražnjih nogu prilikom sjedenja, dvonožnog propinjanja, hodanja po kosini, te penjanju. Za svaki element, na temelju nezavisne procjene dva promatrača - uglavnom doktorandice i mene, ocjenjivale smo zasebno lijevu i desnu nogu, bodovima od nula (potpuni gubitak funkcije; nemogućnost pravilnog korištenja stražnjih nogu) do dva (normalna funkcija). Pritom je smanjenje broja bodova bilo praćeno sve većim oslanjanjem na tarzalnu kost, a sve manjim korištenjem prstiju šape (Brent i sur., 2020). Za potrebe izvođenja ovog testa sastavile smo improvizirani poligon (Slika 12.).



Slika 12. Improvizirani poligon za provođenje testiranja parametara hodanja i držanja, pri čemu bi se štakor postavio u manji plastični kavez (prilikom čega se promatralo sjedenje), pustio da izađe iz nje (prilikom čega se ocjenjivalo propinjanje) i kosinom dođe do svog kaveza (za vrijeme čega se pratilo hodanje po kosini) (A); postavljanjem kaveza na manji kavez i naslanjanjem metalne mrežaste platforme na njega, kada bi se štakor postavio u podnožje mreže, on bi se penjanjem po mrežici vraćao u kavez (kada bi se ocjenjivalo penjanje) (B)

3.4.1.4. Hodanje po šipci (*beam walking*)

Šipku sam postavila 50 cm iznad površine na kojoj se nalazi podnožje te je ona spajala osvijetljenu platformu površine 10cm x 10 cm na koju sam postavljala štakore i zatamnjenu platformu unutar kućice s otvorom 10cm x 10cm, u koju bi štakor naposljetku ušao (Carter i sur., 2001). Vrijeme potrebno za prelazak šipke mjerila sam štopericom između dva označena mjesta međusobne udaljenosti 80 cm (Slika 13.). Za svakog štakora mjerenje sam izvela dvaput, nakon čega sam u obzir uzimala srednju vrijednost. Također, napravila sam dodatna mjerenja ako se životinja spotaknula ili prekinula kretanje.



Slika 13. Hodanje po šipci 50 cm iznad površine, od osvijetljene platforme (krajnje lijevo) do zatamnjene platforme (krajnje desno)

3.4.1.5. Rotarod

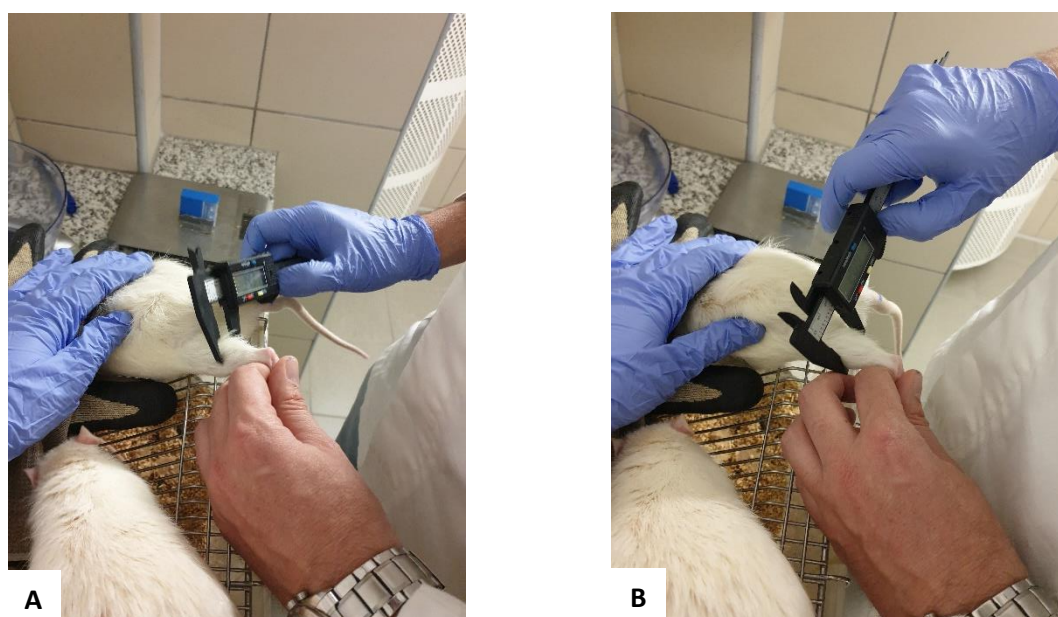
Horizontalno postavljene, rotirajući valjak (pogonjen električnom strujom) promjera 8 cm mentor je prije pokusa podesio na brzinu vrtnje od 13 okretaja po minuti. Kroz ukupno 180 sekundi mjerila sam vrijeme zadržavanja štakora na rotarodu te sam iz dva mjerenja po štakoru računala srednju vrijednost. Štakore sam anteriornim dijelom tijela postavljala suprotno od mjera vrtnje valjka tako da se kreću prema naprijed (**Slika 14.**).



Slika 14. Vrtanja tri štakora istovremeno na rotarodu odijeljenom trima pregradama

3.4.1.6. Atrofija

Promjer lista stražnjih nogu mentor je mjerio pomičnom mjerkom tako da sam za svaku nogu bilježila dvije mjere – po mediolateralnoj i dorzoventralnoj osi (**Slika 15.**). Naposljetku sam iz dvije dobivene mjere izračunala približnu površinu poprečnog presjeka mjenenog područja pomoću formule za izračun površine elipse. Kako bi štakora dovela u položaj tijela koji bi omogućio mjerenje, postavila sam ga na rešetku kaveza te mu pokrila glavu rukom. Za precizniju procjenu mišićne atrofije, životinjama sam mjerila mase *m. gastrocnemius* i *m. soleus* na obje noge nakon žrtvovanja u svrhu imunohistokemije.



Slika 15. Mjerenje promjera stražnjih udova pomičnom mjerkom po mediolateralnoj osi (A) i dorzoventralnoj osi (B) stražnje noge

3.4.1.7. Plivanje

Svakog štakora zasebno postavljala sam u Morrisov bazen napunjen vodom do visine 35-40 cm i promjera 180 cm. Temperaturu vode kojom sam punila bazen namjestila sam na 24°C. Plivanje sam u realnom vremenu pratila putem kamere (postavljene na stropu iznad bazena) u programu za bihevioralnu analizu (Noldus Ethovision, Noldus, Wageningen, Nizozemska). Zbog praćenja podataka i rednog broja nadolazeće snimke, u program sam unijela podatke o oznakama štakora i pripadajućih kaveza. Nakon što sam uključila kameru (konstantno podešene osjetljivosti senzora; engl. *ISO*), u programu sam označila rubove bazena i unijela promjer. Kada sam štakora stavila u vodu, pomicanjem oznake na skali predloženih vrijednosti odredila sam veličinu te spektra valnih duljina objekta koje registrira program (cilj je bio na crno-bijeloj pozadini bazena uočiti dvodimenzionalni, pokretni žuti objekt – štakora, tako

da jasno budu prepoznatljivi i odjeljivi glava, trup i rep). Time je bilo omogućeno praćenje putanje štakora kroz zadano vrijeme. Broj mjerenja u sekundi, što sam također ručno unijela, iznosio je 7,5. Vrijeme snimanja podesila sam na 120 sekundi, tijekom čega su se u svakom trenutku mjerile, primjerice, brzina i akceleracija, dok se naknadno, iz tablice podataka mogu izdvojiti vrijednosti poput ukupne prijeđene udaljenosti. Osim tablica podataka, za sve štakore su, prema unesenim podacima, u programu bile dostupne snimke gibanja ili - zasebno, promjene putanje kroz vrijeme. Sve životinje snimala sam dvaput, pa sam, s tim u skladu, uzimala u obzir srednju vrijednost. Za potrebe ovog eksperimenta, mentor je izdvojio vrijednosti izračuna maksimalne i srednje brzine štakora, pri čemu se raspon 10-100 cm/s smatrao relevantnim. Nakon što sam izvadila životinju iz bazena, smjestila sam je u kavez s metalnom rešetkom na dnu te sam ju, nakon što se dlaka osušila, premjestila u pripadajući kavez.

3.4.2. Imunohistokemija

Reprezentativne uzorke prereza leđne moždine izdvojila sam za svaku tretiranu skupinu životinja te ih raspodijelila u jažice (oko 12 po jažici) (**Slika 16.**). Uzorke sam ispirala u 500 ml PBS tri puta po pet minuta. Potom sam dodala 3%-tni vodikov peroksid te ga ostavila djelovati sat vremena. Nakon toga sam tri puta ispirala uzorke u PBST (PBS s 0.25%-tnim Triton X-100), također po pet minuta. Prereze sam zatim ostavila jedan sat u 500 ml 10%-tnog NGS (u PBST) te zatim ponovila postupak ispiranja u PBST. U sljedećem koraku dodala sam mišje monoklonsko primarno protutijelo na ChAT u razrjeđenju 1:2500 (u PBST i 1%-tnom NGS), od čega sam po 170 μ l mikropipetom dodala u svaku jažicu. Nakon toga je uslijedila inkubacija na 4°C u trajanju od 24 sata, pri čemu sam mikrotitarsku pločicu stavila u vrećicu, kako ne bi došlo do isušivanja uzoraka. Sljedećeg dana ponovila sam trostruko ispiranje u PBST, nakon čega sam uzorke dva sata, u mraku, ostavila inkubirati sekundarnim fluorescentnim protutijelom (kozje protutijelo koje veže mišje primarno protutijelo (engl. *goat anti-mouse*), s fluorescentnim markerom Alexa 555) u razrjeđenju 1:400 (u PBST i 1%-tnom NGS), volumenom od 170 μ l po jažici. Za te potrebe, posudu s uzorcima prekrila sam aluminijskom folijom. S prolaskom vremena inkubacije, uzorke sam nanovo triput ispirala u PBST, nakon čega sam dodala primarno protutijelo na pocijepani SNAP-25 u razrjeđenju 1:8000 (u PBST i 1%-tnom NGS) te sam uzorke 24 sata ostavila inkubirati na sobnoj temperaturi. Sljedećeg dana sam uzorke triput ispirala u PBST te potom na jedan sat ostavila inkubirati sekundarnim protutijelom konjugiranim s peroksidazom hrena (polyHRP). Kao supstrat enzimu u svaku jažicu dodala sam 170 μ l tiramida u PBS (pripremljen tako da je doktorandica dodala 33.3 mg imidazola, 1.66 μ l 3% vodikova peroksida te 50 μ l tiramida vezanog uz fluorofor Atto 488) nakon čega sam posljednji put (triput) ispirala uzorke u PBST. Potom sam uzorke pažljivo, pomoću pipete i kista, nanijela i rasporedila na predmetna stakalca. Kada su se

uzorci djelomično osušili, dodala sam im sredstvo za uklapanje fluorescentnih prereza koje sadrži boju diaminofenilindol (DAPI), nakon čega sam na predmetna stakalca položila pokrovna stakalca.



Slika 16. Poprečni prerezi ledne moždine debljine 35 μm u jažicama tijekom imunohistokemije

3.4.3. Mikroskopiranje

Uzorke sam pregledavala u području ventralnog roga i središnjeg kanala ledne moždine, od najmanjeg do najvećeg povećanja, kako bih vidjela pojedinačne fragmente SNAP-25. Pritom sam koristila fluorescencijski mikroskop (Olympus BX-51, Olympus, Tokyo, Japan) s pripadajućom kamerom (Olympus DP-70, Olympus, Tokyo, Japan). Kako bi u istom kadru vizualizirala fluorescentne markere, koristila sam filtere različitih valnih duljina, zbog čega su zeleno obojeni bili pocijepani proteini SNAP-25 (uslijed emisijskog spektra fluorofora Atto 488), plavo obojena područja bogata adeninom i timinom (jezgre) uslijed vezanja boje DAPI, a crveno obojena područja kolinergičnih neurona korištenjem markera ChAT u kombinaciji sa sekundarnim protutijelom koje sadrži fluorofor Alexa 555.

3.4.4. Statistička obrada podataka

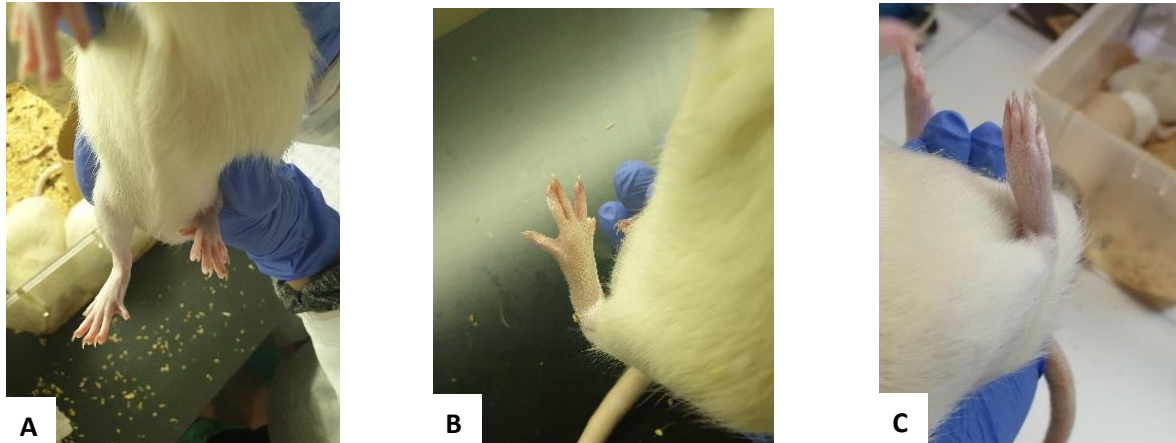
Za statističku obradu podataka koristila sam program GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, California, SAD). Dobivene podatke analizirala sam metodom jednosmjerne varijance (one-way ANOVA) ili dvosmjerne varijance (two-way ANOVA), ako se radilo o ponavljanim mjerenjima. Rezultate sam prikazala u obliku aritmetičke sredine i standardne pogreške aritmetičke sredine (SEM,

engl. *Standard error of mean*). Statističku značajnost između pojedinih eksperimentalnih grupa provjeravala sam Bonferonijevim te Newman-Keuls *post-hoc* testom za višestruku usporedbu, pri čemu sam vrijednost p manju od 0.05 uzimala kao značajnu.

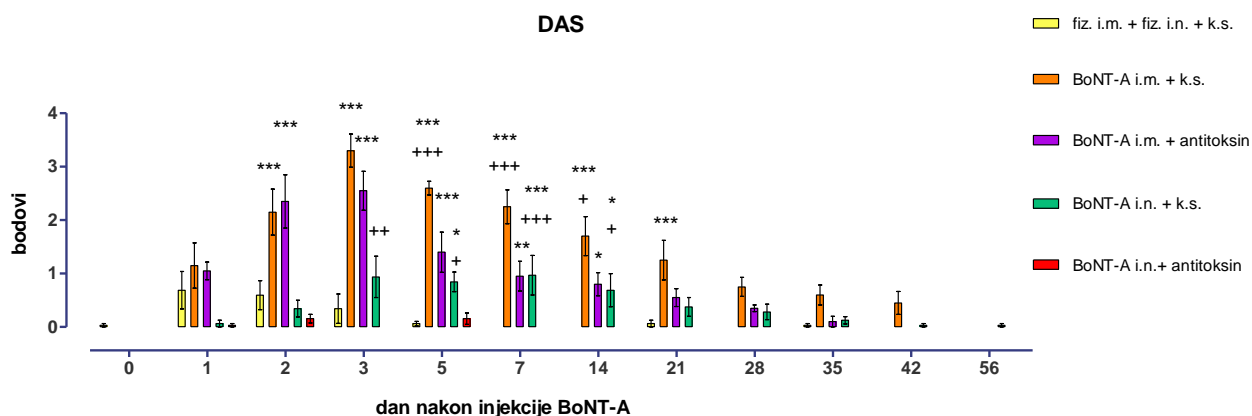
4. REZULTATI

4.1. Mlohava paraliza udaljenih mišića zaduženih za abdukciju nožnih prstiju

Kako bi se pratio vremenski tijek periferne paralizu izazvanu difuzijom toksina u neinjicirane mišiće potkoljenice, promatran je refleks širenja nožnih prstiju. Kontrolna skupina uvijek je pokazivala širenje prstiju punog opsega (osim prvog i drugog dana uslijed oporavka od operacije kod pojedinih životinja), dok su bodovi za ostale skupine štakora varirali s prolaskom vremena (**Slika 17. i Slika 18.**). Nastup mlohave paralize uočen je sljedećeg dana nakon tretmana BoNT-A u mišić, a maksimalni učinak dosegnut je trećega dana. Kod davanja BoNT-A u živac, značajna paraliza je nastupila tek treći dan nakon primjene toksina. Štakori tretirani intramuskularno su bili brže i opsežnije (prema DAS bodovanju) zahvaćeni paralizom u promatranome području u odnosu na one tretirane intraneuralno u živac. Također, kod intraneuralne aplikacije vidljivo je jače djelovanje BoNT/A u eksperimentalnoj grupi koja nije imala spriječen središnji učinak toksina (tj. u kombinaciji s konjskim serumom, nego li s antitoksinom). Početak oporavka životinja može se pratiti od petoga dana, sa završetkom 56. dana pokusa za sve skupine, zbog čega prema kraju pokusa izostaje značajnost podataka (**Slika 18.**).



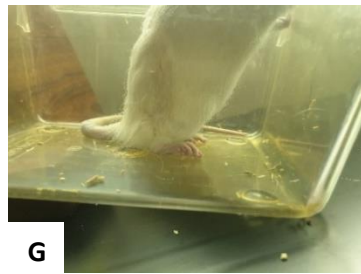
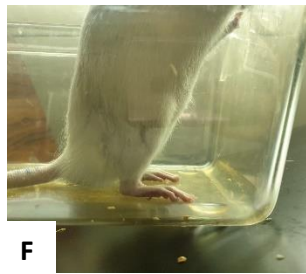
Slika 17. Učinak BoNT-A na refleks abdukcije nožnih prstiju. Potpuno širenje prstiju – DAS skor = 0 (A), razdvajanje četiri prsta – DAS skor = 1 (B), potpuno nerazdvajanje prstiju – DAS skor = 4 (C) prilikom podizanja štakora od podloge držeći ga u vertikalnom položaju



Slika 18. Vremenski tijek oporavka refleksa širenja nožnih prstiju nakon periferno primijenjenog BoNT-A ovisi o središnjim učincima toksina. Rezultati ocjenjivanja refleksa širenja prstiju (DAS skora) po skupinama; aritmetička sredina ± srednja standardna greška. * - $p < 0.05$, * - $p < 0.001$ u odnosu na skupinu fiz. i.m. + fiz. i.n. + k.s.; + - $p < 0.05$, ++ - $p < 0.01$, +++ - $p < 0.001$ u odnosu na skupine BoNT-A i.m./i.n. + antitoksin (dvosmjerna analiza varijance za ponovljena mjerenja i Bonferonijev *post-hoc* test), pri čemu je fiz. kratica za fiziološku otopinu, k.s. za konjski serum, a BoNT-A i.m./i.n. za terapijski pripravak serotipa A botulinskog toksina apliciran intramuskularno ili intraneuralno**

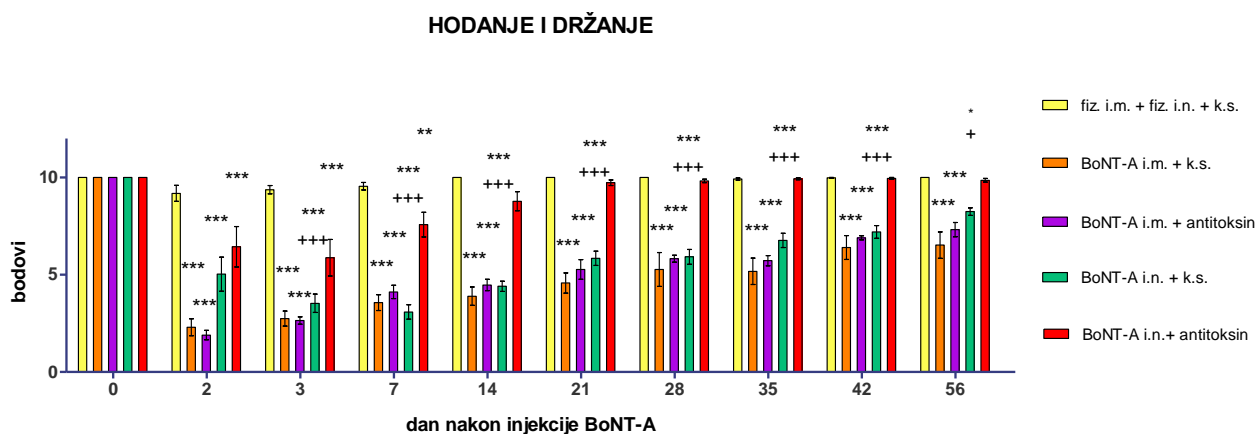
4.2. Učinci BoNT-A na hod i držanje

Testiranje hodanja i držanja pokazalo je kroz vrijeme promjene u ocjenama svih parametara vezanih uz položaj i upotrebu šapica (Slika 19.), dok je abdukcija stražnjih nogu bila očuvana kod podizanja životinja za rep (skor 2/2 kod svih životinja, nije prikazana pojedinačno). Funkcija stražnjih nogu životinja tretiranih i.n. BoNT-A i antitoksinom bila je veća od one u skupine životinja tretiranih konjskim serumom, dok kod životinja tretiranih i.m. BoNT-A, antitoksin nije značajno spriječio ili ubrzao oporavak motoričkih deficita. Nadalje, iako su životinje kroz pokus povratile refleks širenja prstiju, snažniji učinak izvršen je na lokomotorne funkcije pri hodaњу i držaњу, pri čemu do potpunog oporavka za vrijeme pokusa nije došlo (Slika 20. i Slika 21.). Međutim, oporavak je brži kod životinja koje su primile antitoksin. Uz to je izgledno, u odnosu na ostale parametre, da je korištenje nogu prilikom penjanja manje ometeno, odnosno - da inhibirajući učinak toksina pri toj radnji dolazi manje do izražaja. S druge strane, funkcija kretnji pri ekstenziji prstiju u sjedenju, propinjanju i hodaњу po kosini je, promatranjem svake pojedinačne skupine, podjednako narušena.

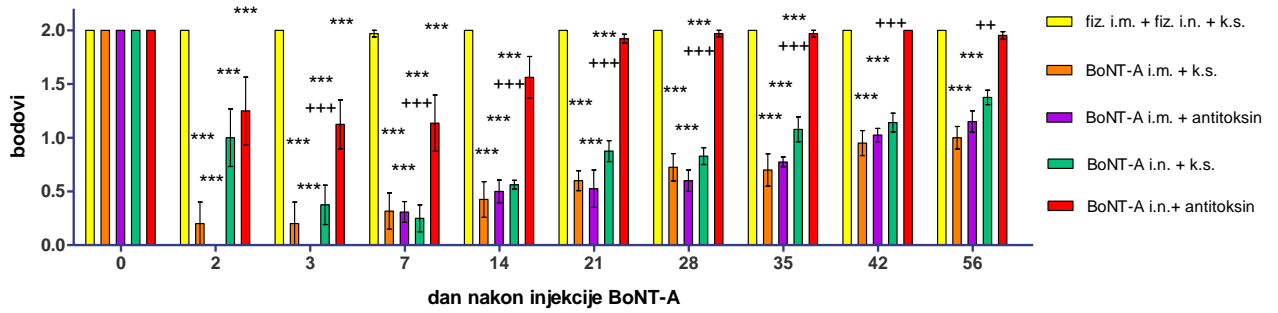
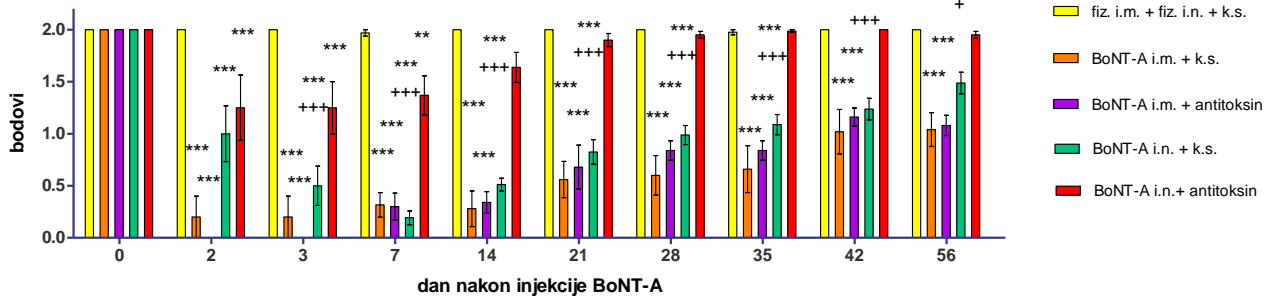
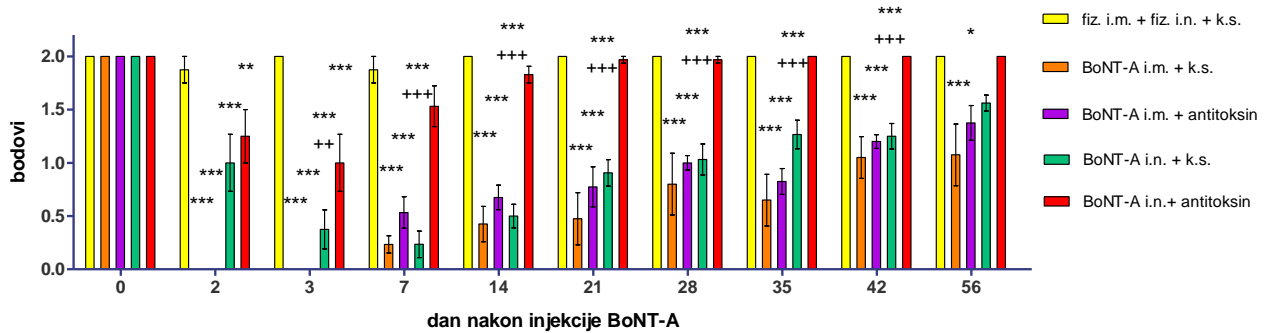




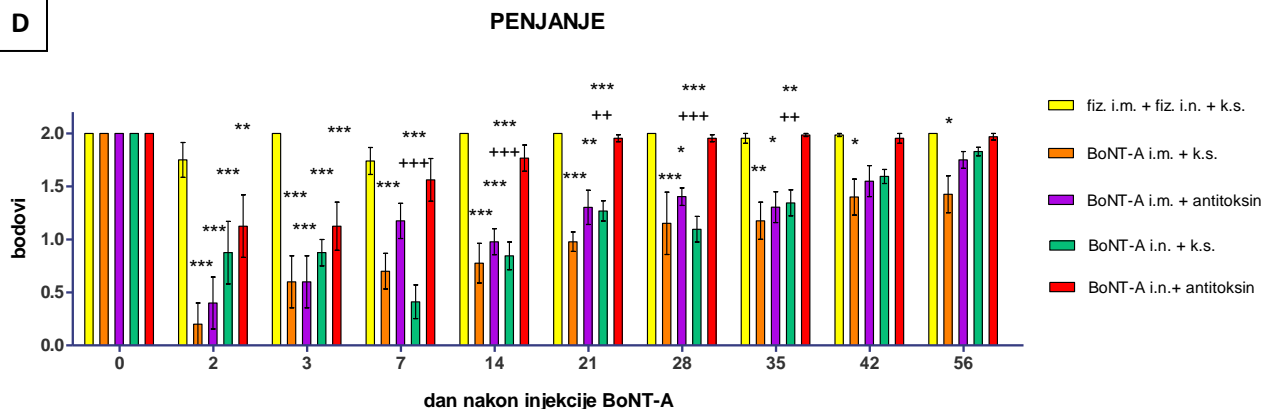
Slika 19. Bodovanje hodanja i držanja prema udjelu korištenja šape u odnosu na normalno izvođenje pokreta (0 bodova) od 2 do 0 bodova kod abdukcije stražnjih nogu prilikom podizanja štakora od podloge za rep (A), sjedenja (B-D), propinjanja (E-G), hodanja po kosini (H-J) i penjanja (K-M)



Slika 20. Vremenski tijek oporavka zbroja parametara hoda i držanja nakon periferne primjene BoNT-A u ovisnosti o središnjim učincima toksina; aritmetička sredina \pm srednja standardna greška. * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$, * - $p < 0.001$ u odnosu na skupinu fiz. i.m. + fiz. i.n. + k.s.; + - $p < 0.05$, +++ - $p < 0.001$ u odnosu na skupine BoNT-A i.m./i.n. + antitoksin (dvosmjerna analiza varijance za ponovljena mjerenja i Bonferonijev *post-hoc* test), pri čemu je fiz. kratica za fiziološku otopinu, k.s. za konjski serum, a BoNT-A i.m./i.n. za terapijski pripravak serotipa A botulinskog toksina apliciran intramuskularno ili intraneuralno**

A**EKSTENZIJA PRSTIJU****B****DVONOŽNO PROPINJANJE****C****HODANJE PO KOSINI**

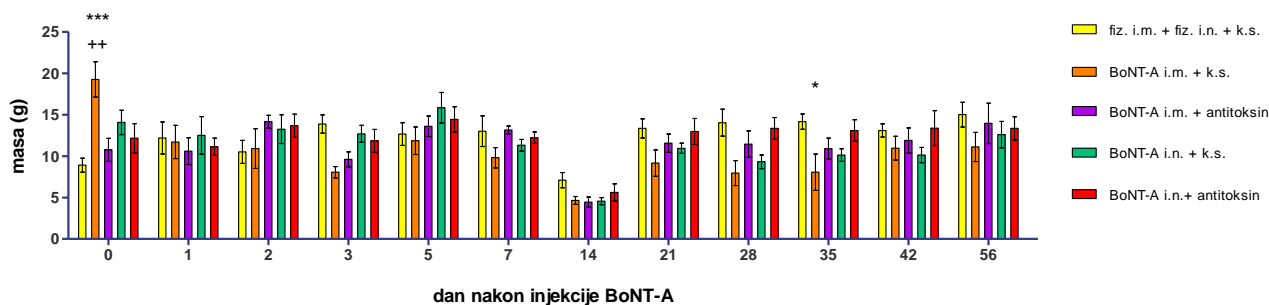
D



Slika 21. Vremenski tijek oporavka pojedinih parametara hoda i držanja nakon periferne primjene BoNT-A u ovisnosti o središnjim učincima toksina. Prikazani su zasebni rezultati ocjenjivanja pojedinačnih parametara hodanja i držanja po skupinama – ekstenzija prstiju pri sjedenju (A), dvonožno propinjanje (B), hodanje po kosini (C) i penjanje (D); aritmetička sredina ± srednja standardna greška. * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$, * - $p < 0.001$ u odnosu na skupinu fiz. i.m. + fiz. i.n. + k.s.; + - $p < 0.05$, ++ - $p < 0.01$, +++ - $p < 0.001$ u odnosu na skupine BoNT-A i.m./i.n. + antitoksin (dvosmjerna analiza varijance za ponovljena mjerenja i Bonferonijev *post-hoc* test), pri čemu je fiz. kratica za fiziološku otopinu, k.s. za konjski serum, a BoNT-A i.m./i.n. za terapijski pripravak serotipa A botulinskog toksina apliciran intramuskularno ili intraneuralno**

Kod mjerenja otpora šapice na dorzifleksiju nisu pronađene značajnije razlike između pojedinih eksperimentalnih skupina što sugerira da su životinje imale sličan tonus prilikom savijanja gležnja. Iako je kod eksperimentalne skupine BoNT-A i.m. koja je primila konjski serum postojala značajnija razlika prije tretmana (dan 0), to je moglo biti uzrokovano nejednakom utreniranošću i mirnoćom životinja prilikom manipulacije (Slika 22.).

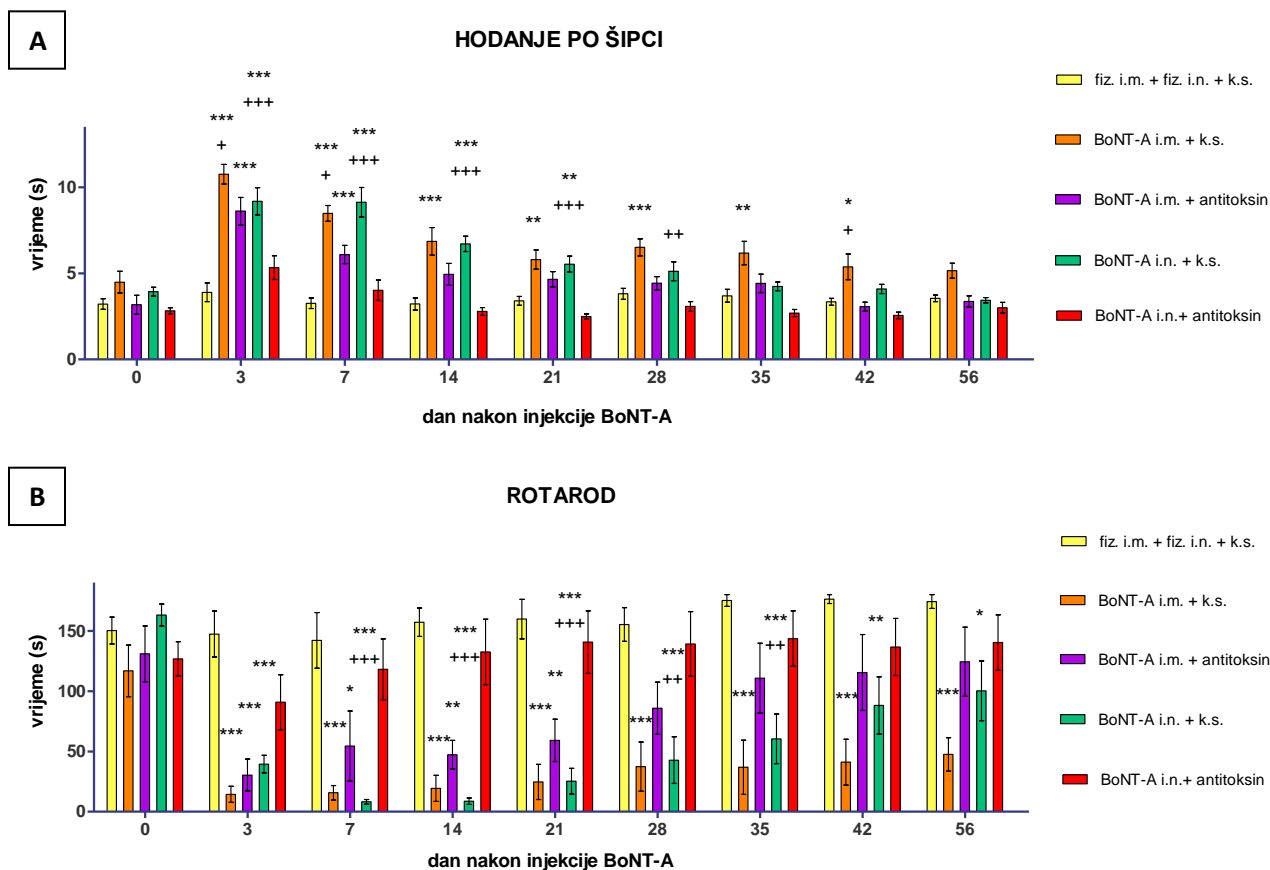
DORZIFLEKSIJA BoNT



Slika 22. Mjerenja dorzifleksije nakon BoNT-A tretmana po skupinama; aritmetička sredina \pm srednja standardna greška. * - $p < 0.05$, *** - $p < 0.001$ u odnosu na skupinu fiz. i.m. + fiz. i.n. + k.s.; ++ - $p < 0.01$ u odnosu na skupine BoNT-A i.m./i.n. + antitoksin (dvosmjerna analiza varijance za ponovljena mjerenja i Bonferonijev *post-hoc* test), pri čemu je fiz. kratica za fiziološku otopinu, k.s. za konjski serum, a BoNT-A i.m./i.n. za terapijski pripravak serotipa A botulinškog toksina apliciran intramuskularno ili intraneuralno

4.3. Koordinacija i izdržljivost

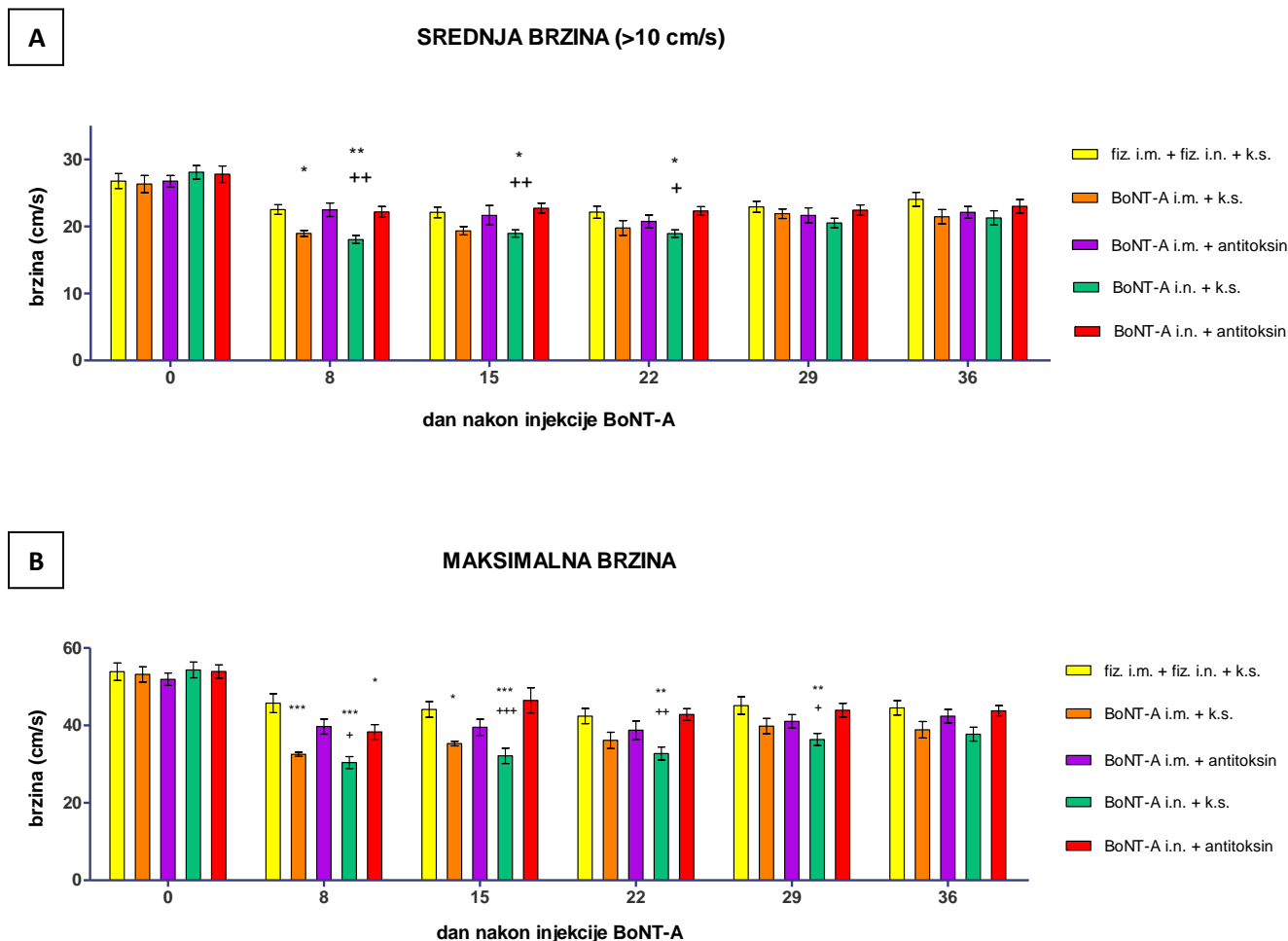
Kako bi se provjerila koordiniranost i kontrolu posture životinja, ispitalo se njihovo vrijeme prelaska preko uske šipke kvadratnog presjeka. Vrijeme potrebno za prelazak uske šipke kroz pokus se povećalo uslijed nastupa djelovanja BoNT-A, a zatim se postepeno smanjivalo te su do 56. dana vrijednosti bile gotovo jednake onima prije tretmana. Iako, u odnosu na životinje tretirane konjskim serumom, zabilježen je trend bržeg oporavka životinja tretiranih antitoksinom. Međutim, u podacima održavanja štakora na rotarodu može se primijetiti izražajnija razlika u postignućima između skupine tretirane antitoksinom i one tretirane konjskim serumom (**Slika 23.**).



Slika 23. Oporavak koordinacije i izdržljivosti kod periferno primijenjenog BoNT-A ovisi o središnjim učincima toksina. Mjerenja koordinacije i izdržljivosti održavanjem i kretanjem na povišenoj šipci (A) i rotarodu (B) po skupinama; aritmetička sredina ± srednja standardna greška. * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$, * - $p < 0.001$ u odnosu na skupinu fiz. i.m. + fiz. i.n. + k.s.; + - $p < 0.05$, ++ - $p < 0.01$, +++ - $p < 0.001$ u odnosu na skupine BoNT-A i.m./i.n. + antitoksin (dvosmjerna analiza varijance za ponovljena mjerenja i Bonferonijev *post-hoc* test), pri čemu je fiz. kratica za fiziološku otopinu, k.s. za konjski serum, a BoNT-A i.m./i.n. za terapijski pripravak serotipa A botulinskog toksina apliciran intramuskularno ili intraneuralno**

4.4. Plivanje

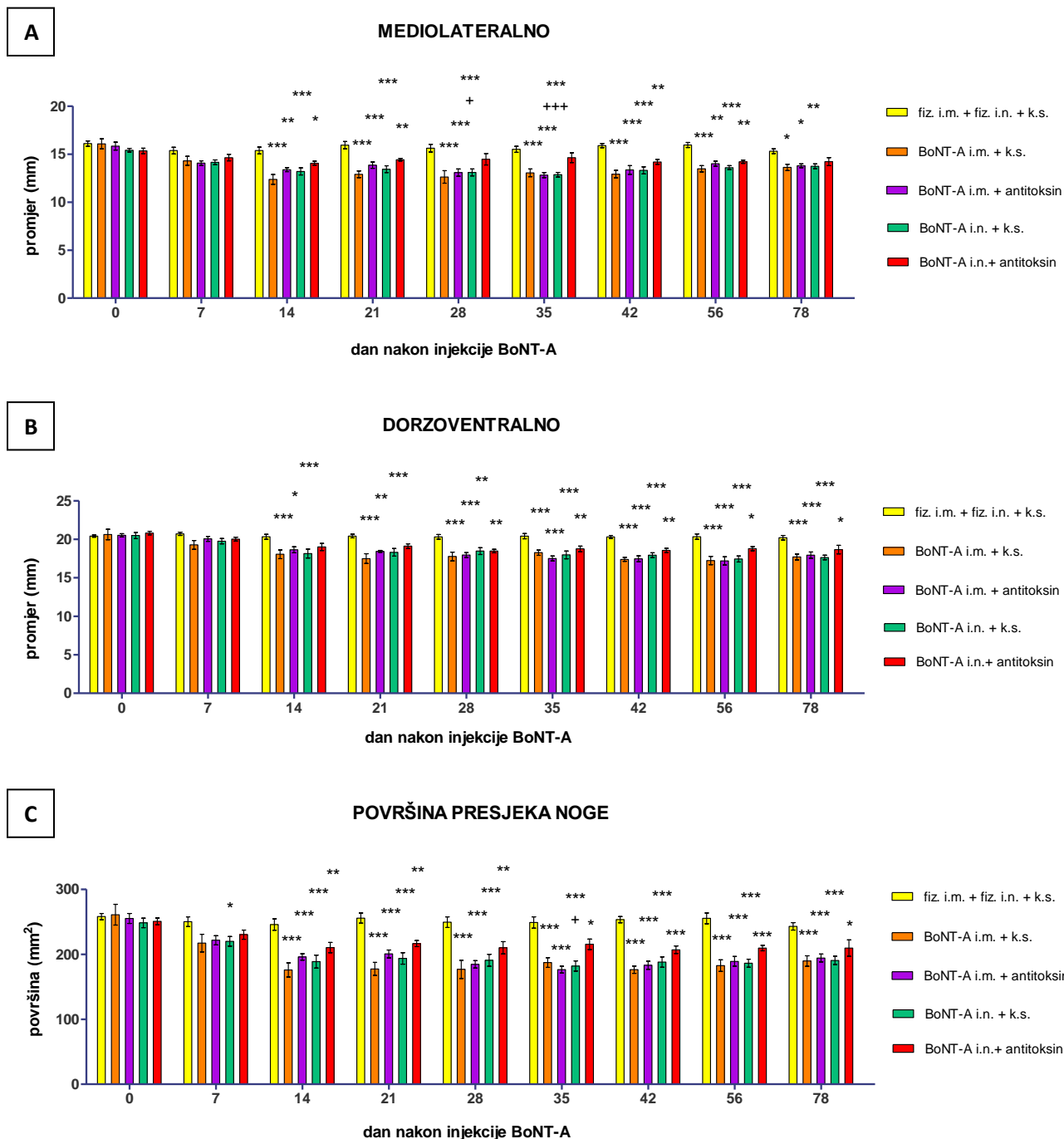
Rezultati dobiveni iz analize plivanja od osmoga dana za promatrani dan također pokazuju da BoNT-A primijenjen periferno (i.m. i i.n.) smanjuje srednju brzinu plivanja (ograničenu na brzine iznad 10 cm/s) i maksimalnu brzinu plivanja. Također, vidljivo je da tretman i.t. antitoksinom sprječava učinak BoNT-A. Smanjenje brzine plivanja uzrokovano i.m. BoNT-A je manje i kratkotrajnije nego nakon i.n. BoNT-A. Nakon 29. dana povećavaju se vrijednosti brzina svih skupina tretiranih BoNT-A, što se nastavlja do kraja pokusa (Slika 24.).



Slika 24. Smanjenje brzine plivanja uzrokovano periferno primijenjenim BoNT-A, u ovisnosti o središnjem učinku toksina. Srednja (A) i maksimalna brzina (B) kod plivanja po skupinama (uz izuzeće rezultata manjih od 10 cm/s); aritmetička sredina ± srednja standardna greška. * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$, * - $p < 0.001$ u odnosu na skupinu fiz. i.m. + fiz. i.n. + k.s.; + - $p < 0.05$, ++ - $p < 0.01$, +++ - $p < 0.001$ u odnosu na skupine BoNT-A i.m./i.n. + antitoksin (dvosmjerna analiza varijance za ponovljena mjerenja i Bonferonijev *post-hoc* test), pri čemu je fiz. kratica za fiziološku otopinu, k.s. za konjski serum, a BoNT-A i.m./i.n. za terapijski pripravak serotipa A botulinskog toksina apliciran intramuskularno ili intraneuralno**

4.5. Atrofija

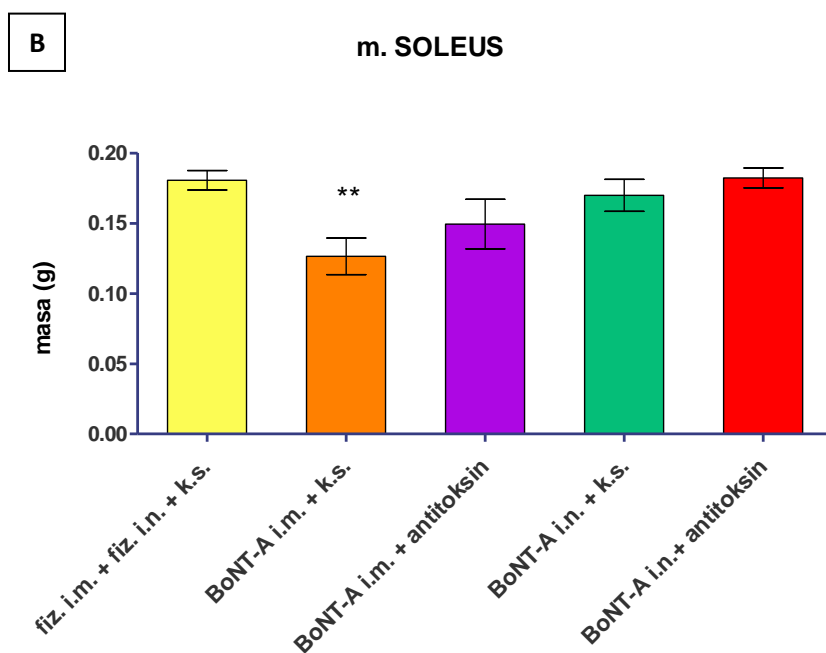
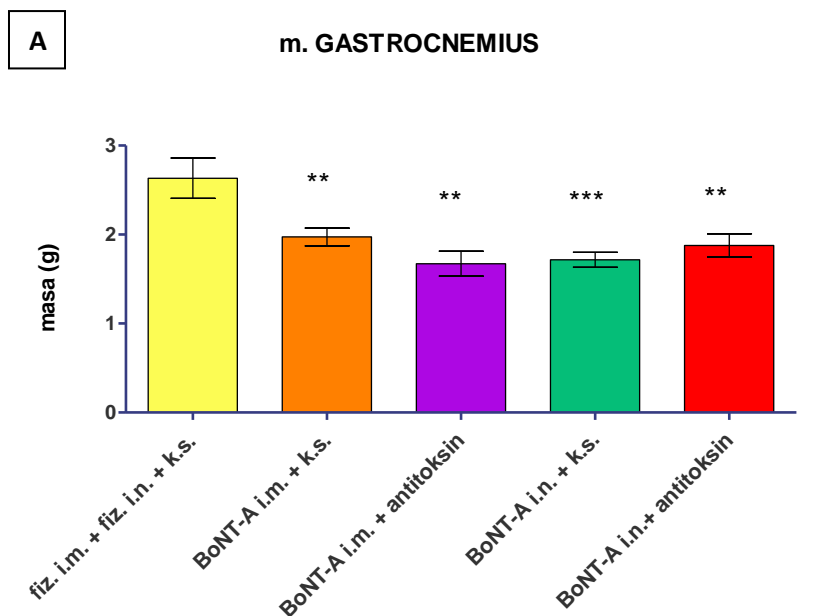
Dugotrajnim neuroparalitičkim djelovanjem dolazi do smanjenja upotrebe skeletnog mišića i njegove posljedične atrofije koja se ispitala kako bi se procijenila moguća uloga središnje-djelujućeg toksina na njen nastanak i oporavak. Pomičnom mjerkom dobiveni su rezultati koji pokazuju značajno smanjenje opsega potkoljenice već od 14. dana. Usporedno sa štakorima kojima je injiciran konjski serum, štakori tretirani antitoksinom pokazuju sličan promjer noge po mediolateralnoj i dorzoventralnoj osi stražnje noge. Općenito, prisutan je spori oporavak smanjenja opsega potkoljenice tijekom cijelog pokusa (Slika 25.).



Slika 25. Mjerena promjera stražnje noge po mediolateralnoj osi (A) i dorzoventralnoj osi (B) te površina presjeka noge izračunata na temelju A i B po skupinama; aritmetička sredina ± srednja standardna greška. * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$, * - $p < 0.001$ u odnosu na skupinu fiz. i.m. + fiz. i.n. + k.s.; + - $p < 0.05$, +++ - $p < 0.001$ u odnosu na skupine BoNT-A i.m./i.n. + antitoksin (dvosmjerna analiza varijance za ponovljena mjerenja i Bonferonijev *post-hoc* test), pri čemu je fiz. kratica za fiziološku otopinu, k.s. za konjski serum, a BoNT-A i.m./i.n. za terapijski pripravak serotipa A botulinskog toksina apliciran intramuskularno ili intraneuralno**

Masa *m. gastrocnemius* svih tretiranih životinja (dakle, osim kontrolne skupine) manja je od 2 g, što je posljedica atrofije uzrokovane injekcijama BoNT-A. Skupina tretirana i.n. koja je primila

antitoksin pokazuje slične rezultate kao i skupina tretirana i.m. koja nije primila antitoksin – u prosjeku 1.87 g naspram 1.97 g. Nadalje, na sličan način podudaraju se rezultati skupine tretirane BoNT-A i.m., koja je primila antitoksin te skupine tretirane i.n. bez dobivenog antitoksina (1.67 g naspram 1.71 g). Ako se masi *m. gastrocnemius* pribroji i masa *m. soleus*, i dalje vrijedi sličan odnos masa između skupina. Međutim, zasebnim vaganjem *m. soleus* može se primijetiti kako skupina koja je primila BoNT-A (i.m.) i konjski serum (i.t.) ima smanjenu masu mišića u odnosu na druge eksperimentalne grupe (**Slika 26.**).



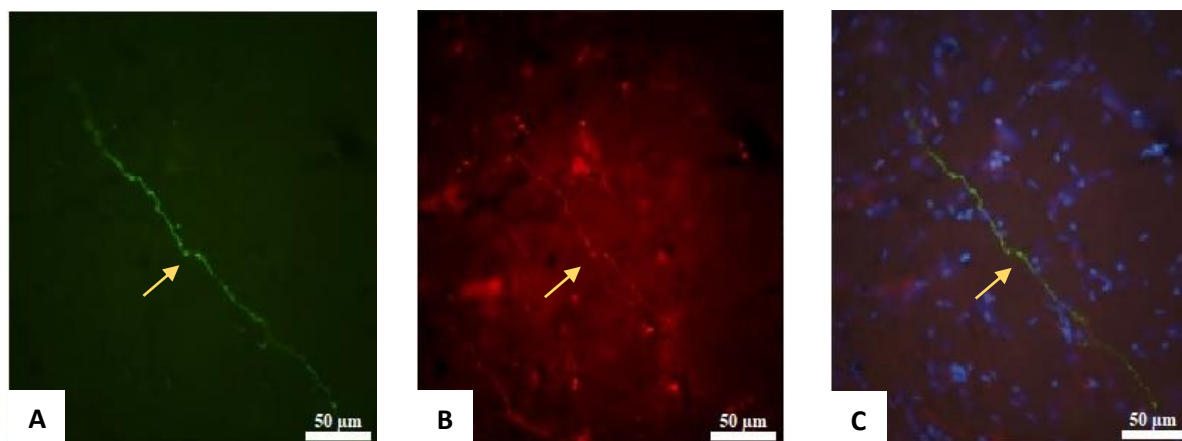
Slika 26. Utjecaj periferno primijenjenog BoNT-A na mišiće. Podaci prikazuju mase mišića dobivene vaganjem *m. gastrocnemius* (A) te *m. soleus* (B); aritmetička sredina ± srednja standardna greška. ** - $p < 0.01$, * - $p < 0.001$ u odnosu na skupinu fiz. i.m. + fiz. i.n. + k.s. (jednosmjerna analiza varijance za jednostruka mjerenja i Newman-Keuls *post-hoc* test višestruke usporedbe), pri čemu je fiz. kratica za fiziološku otopinu, k.s. za konjski serum, a BoNT-A i.m./i.n. za terapijski pripravak serotipa A botulinskog toksina apliciran intramuskularno ili intraneuralno**

4.6. Imunohistokemija

Pocijepani SNAP-25 zapažen je u području ventralnog roga leđne moždine svih skupina tretiranih BoNT-A, uz manju učestalost u skupine tretirane i.n. koja je primila antitoksin (**Slika 27.**), pri čemu jezgre tkiva fluoresciraju na valnoj duljini koja odgovara plavoj boji (obojene DAPI bojom), ChAT na valnoj duljini u crvenom dijelu spektra (preko protutijela obilježenih fluoroforom Alexa 555), a SNAP-25 na valnoj duljini u zelenom dijelu spektra (preko protutijela obilježenih fluoroforom Atto 488, na temelju interakcije protutijela s vezanim enzimom te supstrata s vezanim fluoroforom). Kako bi se utvrdilo područje pocijepanih SNAP proteina, tkivo je pregledano na istom povećanju odvojenim korištenjem filtera za svjetlost koju emitiraju fluorofori Alexa 555 i Atto 488, iz čega je proizašlo da su pocijepani proteini ograničeni na područje kolinergičnih neurona, odnosno, da su SNAP-25 i ChAT kolokalizirani (**Slika 28.**)



Slika 27. Poprečni prerez leđne moždine štakora tretiranog BoNT-A i.m., fiziološkom otopinom i.n. i konjskim serumom i.t. u stupcu mjerila 500 μm , pri čemu je pocijepani SNAP-25 obilježen svjetlozeleno (žuta strelica), ChAT crveno, a jezgre plavo, pri čemu je BoNT-A i.m. kratica za terapijski pripravak serotipa A botulinskog toksina apliciran intramuskularno, SNAP-25 za sinaptosomalni protein molekulske mase 25 kDa, a ChAT za kolin-acetiltransferazu.



**Slika 28. Kolokalizacija pocijepanog SNAP-25 i markera kolinergičnih neurona kolin-acetiltransferaze (ChAT) u ventralnom rogu lumbalnog dijela kralježnične moždine nakon periferne i.m. primjene BoNT-
A. Prvi i drugi panel pokazuju pojedinačna bojenja pocijepanog SNAP-25 (A), ChAT (B) te kombinacija dva prikaza s bojenjem jezgri pomoću DAPI (C). Položaj pocijepanog SNAP-25 i ChAT-pozitivnog vlakna je prikazan žutom strjelicom. Mjerilo iznosi 50 µm, pri čemu je SNAP-25 kratica za sinaptosomalni protein molekulske mase 25 kDa, ChAT za kolin-acetiltransferazu, a DAPI za diaminofenilindol.**

5. RASPRAVA

5.1. Dugotrajni motorički učinci BoNT-A u motoričkom sustavu

U rezultatima provedenog eksperimenta očito je vidljivo vremensko nepoklapanje perifernih i središnjih učinaka BoNT-A. Iako su se štakori, promatrajući DAS (a time i direktan, lokalni učinak), oporavljali od petog dana, njihova koordinacija i izdržljivost (mjereni pomoću hodanja po šipci i vrtnji na rotarodu), za usporedbu, bili su dulje narušeni (uspoređujući iste skupine životinja), uz sporiji oporavak koji nije dovršen. Nastavno na to, primarno u dorzifleksiji stopala sudjeluju anteriorni mišići potkoljenice, pri čemu dolazi do refleksnog širenja prstiju mjenjenog DAS bodovanjem. Prema tome, DAS se mijenja samo kao posljedica difuzije BoNT-A iz *m. gastrocnemius* u *m. extensor digitorum longus* i *m. tibialis anterior* (Broide i sur., 2013). Osim koordinacije i izdržljivosti, i druge skupine parametara bile su zahvaćene izražajnim središnjim učinkom BoNT-A, koji, iako prisutan otpočetak, počinje dolaziti do izražaja sa smanjenjem perifernih učinaka. Uslijed smanjenja tonusa mišića i izostanka kontrakcije, primarno kao posljedice povećanja stope razgradnje proteina, ali i smanjenjem stope sinteze proteina, dolazi do atrofije, koja je bila jasno uočljiva kroz pokus. Sinteza proteina uglavnom je regulirana u koraku inicijacije i elongacije translacije mRNA, a razgradnja proteina odvija se putem ubikvitin-proteosomalnog sustava te lizosomalne proteolize, prvotno proteina miofibrila koji čine više od polovice ukupnih proteina skeletnog mišića (Jackman i Kandarian, 2004). U ovom se eksperimentu injekcijom BoNT-A u *m. gastrocnemius* želio pokazati učinak ograničen na sinapse ciljanog mišića uz eventualnu difuziju u okolno područje, a injekcijom u *n. ischiadicus* učinak nizvodno od mjesta aplikacije, na sve mišiće koji su njime inervirani. S tim u vezi, pokazano je djelovanje BoNT i na *m. soleus*, uz pretpostavku da je ono skup djelovanja perifernih i središnjih učinaka. Kod plivanja, kao primjera intenzivne motoričke akcije gdje životinja koristi više skupina mišića, očita je kompenzacija aktivnosti mišićima koji nisu bili zahvaćeni djelovanjem BoNT, što kod skupine kojima je toksin apliciran i.n. nije bilo moguće, a učinak je bio vidljiv dulje nego li u skupine tretirane i.m. (kao i kod promatranja drugih parametara). Analiza hoda i držanja (Brent i sur., 2020) u ovom je pokusu uvedena kao metoda kojom će se potkrijepiti rezultate mlohavne paralize dobivene određivanjem DAS. Brent i suradnici analizirali su kroz opisane parametre gubitak koštane mase nakon injekcije BoNT-A u nekoliko različitih mišića natkoljenice i potkoljenice.

U dosadašnjim istraživanjima evaluacije učinka BoNT-A drugih autora, primjerice Ma i suradnika (2004), u trajanju od jedne godine od i.m. injekcije 6U/kg unilateralno u *m. gastrocnemius* (jednakog volumena BoNT-A u medijalni i lateralni trbuh), uobičajeno se u obzir uzimala masa mišića, kao i vrijednosti amplitude i latencije pri elektrofiziološkim mjerenjima. Mjerenja su vršena upotrebom stimulacijske elektrode, elektrode za bilježenje nastalog impulsa, elektrode za uzemljenje te amplifikatora mjernog uređaja. Slično tome, pomoću Kirschnerovih žica (K-žica), električnim

generatorom (uređaj koji kinetičku energiju prevodi u električnu) pratilo se nastajanje sile u mišiću prilikom izometričke kontrakcije - uzastopnim stimuliranjem uz povećavanje napona od pojave trzaja (kontrakcija jedne motoričke jedinice) sve do postizanja tetaničke kontrakcije (kontrakcije svih motoričkih jedinica mišića), što se bilježilo oscilografom. Osim toga, vršena je morfometrija NMJ koja podrazumijeva određivanje parametara poput površine NMJ, broja mjesta grananja aksona, duljine najduljeg ogranka i broja aksonskih završetaka upotrebom fluorescencijskog mikroskopa. U usporedbi s ovim istraživanjem, prisutno je poklapanje u rezultatima mjerenja atrofije (u ovom istraživanju pokazano mjerama stražnjih udova po dorzoventralnoj i mediolateralnoj osi) gdje je maksimum zabilježen dva tjedna od tretmana toksinom u oba slučaja, pri čemu je u istraživanju Ma i suradnika došlo do smanjenja mase mišića od 32% u odnosu na drugu nogu, a nakon godine dana do gotovo potpunog oporavka. Kako su u ovom istraživanju mišići vagani nakon žrtvovanja, a injekcija bila bilateralna, mogu se usporediti podaci životinja tretiranih i.m. te kontrolne skupine, što nakon 78 dana od davanja toksina čini razliku od 25% (omjer prosječnih masa *m. gastrocnemius*). Međutim, razlika u površini poprečnog presjeka stražnjih nogu kontrolne i tretirane skupine dva tjedna od davanja iznosi 28%. Do opažanja promjena CMAP (smanjenje) te latencije (povećanje) dolazilo je u prva tri dana od davanja toksina, pri čemu CMAP iznosi 28% vrijednosti kontrole, a period latencije 145% vrijednosti kontrole, nakon čega se vrijednosti počinju vraćati na normalne uz značajniji povrat neurotransmisije nakon tri mjeseca te nastupanje potpunog oporavka nakon godine dana. Do potpunog oporavka u motoričkoj funkciji dolazi tek kada ulogu neurotransmisije preuzmu oporavljena živčana vlakna, dok se u međuvremenu neurotransmisija odvija putem novonastalih, nemijeliniziranih, ogranaka aksona koji imaju znatno veći prag podražljivosti od onih mijeliniziranih. Međutim, pokazalo se kako se povećana površina i broj nikotinskih receptora postsinaptičke membrane zadržavaju i nakon godine dana od tretiranja BoNT-A i.m. Naposljetku, pokazano je da je slabost mišića znatna u periodu od tri mjeseca nakon i.m. davanja BoNT-A, no u potpunosti nestaje nakon godine dana. Za takvo što predložena su dva objašnjenja: toksin u odjeljcima aksona opstaje dulje vrijeme pri čemu zadržava proteolitičku aktivnost ili se fragmenti pocijepanog SNAP-25 ne mogu razgraditi te je tako fizički ometeno umetanje novosintetiziranih, funkcionalnih SNAP-25 na području aksonskih okončina (Ma i sur., 2004).

Jedno od prvih istraživanja dugotrajnog učinaka BoNT na motoričku funkciju jest ono Duchena i Strich (1968), prilikom čega je dva tjedna od i.m. injekcije u *m. gastrocnemius* miša također zamijećen vrhunac atrofije. Međutim, osim morfologije NMJ, dodavanjem supstrata poput butiriltiokolina jodida i acetiltiokolina jodida, putem elektronskog mikroskopa pratila se i lokalizacija AChE. Završeci motoričkih vlakana nalaze se u neposrednoj blizini područja invaginacija sarkoleme, gdje je u fiziološkim uvjetima AChE koncentrirana. U konkretnom istraživanju, aktivnost AChE ostala je vezana uz područja invaginacija sarkoleme, dok je u području nicanja živčanih završetaka prevladavao difuzni raspored nespecifičnih kolinesteraza. Pritom je raspored produkta bio sve nepravilniji (u skladu s grananjem) s odmicanjem od tretmana BoNT (Duchen, 1971). Kod *m. soleus*, sačinjenog od

sporokontrahirajućih vlakana, nicanje novih ogranaka zamijećeno je četiri dana od tretmana, dok isti događaj u *m. gastrocnemius*, sačinjenog većinom od brzokontrahirajućih vlakana, započinje četiri tjedna od i.m. injekcije BoNT-A. Međutim, niti nakon devet mjeseci, koliko su trajale histološke analize, nije došlo do restrukturiranja NMJ u prvotni oblik (Duchen i Strich, 1968). Bez obzira što su prethodna istraživanja postavila temelj za ona aktualna, manjkavost u interpretaciji rezultata leži u izuzimanju središnjeg učinka BoNT u obzir, što je najvećim dijelom zbog nedovoljnog znanja o aksonalnom transportu, odnosno njegovu značenju u napuštanju mjesta aplikacije ovoga toksina.

Detekcija i kvantifikacija pocijepanih fragmenata SNAP-25 korištenjem specifičnih protutijela uobičajeno se vrši provođenjem imunohistokemijskog bojenja ili pak *Western blot* metode, kao što je to, primjerice, u istraživanju Antonuccija i suradnika (2008) provedeno za ekstrakt proteina mišjih hipokampusu. Kada se radi o imunohistokemiji, kod detekcije pocijepanih fragmenata dovoljna je kolokalizacija s odabranim markerom. Slično kao i u ovom istraživanju, kolokalizacija je dobivena i u istraživanju Restanija i suradnika (2011), ali za područje tektuma, nakon intraokularne aplikacije BoNT-A i BoNT-E. Za kvantifikaciju signala u vidnom polju upotrebom softvera bilo je moguće ukloniti pozadinsku fluorescenciju. Za usporedbu, u ovom se istraživanju imunohistokemijsko bojanje provodilo na prerezima leđne moždine, nakon i.m. i i.n. aplikacije BoNT-A. Kako je prisustvo nekolicine fragmenata SNAP-25 utvrđeno i u skupine tretirane antitoksinom, to je moguće objasniti time da je antitoksin apliciran u jednoj dozi koja se razrijedila, a naposljetku i resorbirala unutar cerebrospinalne i ostalih izvanstaničnih tekućina. Samim time, pretpostavlja se da djelovanje antitoksina nije pokrilo cijeli vremenski okvir odvijanja transcitoze toksina.

5.2. Djelovanje BoNT posredovano transcitozom

Kako bi se utvrdilo je li pocijepani SNAP-25 pronađen u središnjem živčanom sustavu (facijalnim jezgrama) zaista posljedica retrogradnog aksonalnog transporta biološke aktivne tvari (enzima), kako je prethodno opisano, ili pocijepanog supstrata s periferije, Caleo i suradnici (2018) napravili su aksotomiju facijalnog živca 18 sati nakon periferne administracije toksina. S obzirom da su u facijalnim jezgrama svejedno bile prisutne značajne količine pocijepanog SNAP-25, to se moglo objasniti jedino transportom BoNT-A u prvih nekoliko sati od periferne aplikacije, uz uvjet zadržavanja aktivnosti enzima. Nadalje, unos antitoksina u cerebrospinalnu tekućinu pokazao je smanjeni udio pocijepanog SNAP-25 u CNS u odnosu na skupine koje nisu bile tretirane antitoksinom, međutim, poznato je kako antitoksin ne ulazi u stanice, osim u slučaju narušavanja integriteta membrane – primjerice, formiranjem pora (Bartels i sur., 1994). S tim u skladu, očito je kako BoNT-A nakon periferne aplikacije napušta područje motoričkih neurona i cijepa SNAP-25 u neuronima drugog reda (Caleo i sur., 2018). Također,

do eksperimenta opisanoga u ovome radu, ograničeni su podaci o središnjem učinku BoNT-A na motoričku funkciju.

Skup bihevioralnih testova za procjenu motoričke funkcije uslijed djelovanja BoNT korišten u ovom istraživanju prethodno je, izuzev plivanja, korišten u istraživanju Mataka iz 2020. Pritom je BoNT-A injiciran i.m. ili i.n. životinjama kod kojih je prethodno injekcijom TeNT izazvan spazam, nakon čega su se 13 dana pratile promjene. Injekcija BoNT-A i.m. u naredna je tri dana smanjila otpor pri dorzifleksiji tibiotarznog zgloba do vrijednosti sličnih kontrolnoj grupi, dok je i.n. injekcija rezultirala pojavom istoga ishoda nakon trećeg dana. Slično tome, DAS skor bitno se smanjio kod životinja tretiranih i.m., dok se kod onih tretiranih i.n. nije značajno promijenio. Naposljetku, pokazano je kako je i.t. primjena antitoksina smanjila učestalost pojavnosti pocijepanih SNAP-25 za obje skupine životinja te da je antispastični efekt BoNT kod i.n. davanja primjenom antitoksina izbjegnut, a što je posebno došlo do izražaja kod DAS bodovanja. Slično opisanome, istraživanja su prethodno proveli Caleo i suradnici (2018). Kako je i vidljivo, u usporedbi s ovim konkretnim istraživanjem, prethodna istraživanja pokazala su djelovanje na spazam uzrokovan TeNT, no nisu promatrala učinke BoNT-A na normalnu motoriku.

S obzirom da su rezultati imunohistokemije pokazali prisutnost pocijepanih SNAP-25 ograničenu na kolinergične markere, s obzirom na dugotrajnu aktivnost enzima te relativno mali broj pocijepanih SNAP-25 potrebnih za blokadu sinaptičkog prijenosa, ostaje pitanje djelovanja na druge tipove sinapsi. Donedavno se smatralo da je djelovanje BoNT svojstveno isključivo za kolinergične neurone, međutim, uglavnom u *in vitro* uvjetima dokazano je, primjerice, blokiranje lučenja serotonina, dopamina, noradrenalina, glutamata, gama-aminomaslačne kiseline, tvari P i CGRP (Matak i Lacković, 2014). Poznato je da veliki živčani završeci spinalnih kolinergičnih interneurona (engl. *C boutons*) aktivacijom m2 i m3 tipa muskarinskih receptora u sisavaca reguliraju ekscitabilnost motoričkih neurona tijekom pokreta, s naglaskom na one brze. Radi se o takozvanim V_{0C} neuronima, za koje se smatra da potječu od jedne ili više populacija spinalnih interneurona, a koji su koncentrirani oko some i proksimalnih dendrita motoričkih neurona (Zagoraiou i sur., 2009). Aktivacija muskarinskih receptora kaskadom reakcija mijenja propusnost ionskih kanala za kalijeve ione, čime dolazi do inhibicije hiperpolarizacije. Posljedica toga jest smanjenje refrakturnog perioda, a time i povećanje frekvencije okidanja AP (Miles i sur., 2007). Međutim, budući da nisu poznati selektivni molekularni markeri kolinergičnih interneurona ovoga tipa (već samo za pojedine subtipove), djelovanje ovog sustava, a posebno njegov utjecaj na motorički sustav sisavaca tek treba biti detaljnije razjašnjeno. Mnogi od dosadašnjih uvida u kolinergičku modulacijsku funkciju dobiveni su farmakološkim manipulacijama sustava kolinergičkih receptora, pri čemu je njihova opsežna distribucija predstavljala izazov (Wess, 2003). Prema tome, nepotpuno je znanje o doprinosu pojedinih subtipova spinalnih kolinergičkih interneurona specifičnim ponašanjima, a podloga središnjeg učinka BoNT-A ne bi se trebala ograničiti na samo te sinapse.

6. ZAKLJUČAK

Središnje djelovanje BoNT-A na motoričke sposobnosti u štakora direktno je dokazano vizualizacijom pocijepanih SNAP-25 u leđnoj moždini. Osim toga, presjek rezultata bihevioralnih testova jasno pokazuje kako središnji učinak traje dulje od perifernog.

Zapaženo je kako se životinje koje su primile antitoksin oporavljaju brže od ostalih te s vremenom postižu rezultate slične kontrolnoj skupini. Takav učinak neusporedivo je izraženiji u životinja kojima je BoNT-A injiciran intraneuralno, iz čega proizlazi da je djelovanje antitoksina primarno središnje. Relativno mala zapažena atrofija štakora, kao i rezultati ostalih mjerenja za ovu skupinu mogu se objasniti time što antitoksin sprječava povratak određene količine BoNT-A iz središnjeg živčanog sustava u mišiće, što posebno do izražaja dolazi kod plivanja, gdje su u upotrebi svi mišići uda.

Na temelju svega uočenoga i opisanoga u prethodnom tekstu, može se reći kako je oporavak rezultat zbirnih perifernih i središnjih učinaka BoNT-A koji se vremenski ne poklapaju. Međutim, dodatna istraživanja potrebna su kako bi se odijelili periferni od središnjih učinaka, odnosno, kako bi se utvrdilo koliko je promjena u masi (i funkciji) *m. soleus* bila posljedica lokalne difuzije toksina, a koliko njegova učinka u CNS-u.

Naposljetku, svojstva središnjeg učinka BoNT-A od iznimnog su značaja za kliničku upotrebu gdje se ovaj toksin sve više upotrebljava u liječenju poremećaja pokreta. S tim u skladu, očekuju se daljnja istraživanja njegova utjecaja na stanja spasticiteta i distonije, za što, prije svega, predstoji razvoj kvalitetnih životinjskih modela.

7. LITERATURA

Ahmed, N. Y., Knowles, R., i Dehorter, N. (2019). New insights into cholinergic neuron diversity. *Frontiers in molecular neuroscience*, 12, doi: 10.3389/fnmol.2019.00204.

Antonucci, F., Rossi, C., Gianfranceschi, L., Rossetto, O., i Caleo, M. (2008). Long-distance retrograde effects of botulinum neurotoxin A. *Journal of neuroscience*, 28(14), 3689-3696.

Aoki, K. R. (2001). A comparison of the safety margins of botulinum neurotoxin serotypes A, B, and F in mice. *Toxicon*, 39(12), 1815-1820.

Bach-Rojecky, L., Relja, M., i Lacković, Z. (2005). Botulinum toxin type A in experimental neuropathic pain. *Journal of neural transmission*, 112(2), 215-219.

Bach-Rojecky, L., Dominis, M., i Lacković, Z. (2008). Lack of anti-inflammatory effect of botulinum toxin type A in experimental models of inflammation. *Fundamental & clinical pharmacology*, 22(5), 503-509.

Bach-Rojecky, L., i Lackovic, Z. (2005). Antinociceptive effect of botulinum toxin type a in rat model of carrageenan and capsaicin induced pain. *Croatian medical journal*, 46(2), 201-208.

Bach-Rojecky, L., i Lacković, Z. (2009). Central origin of the antinociceptive action of botulinum toxin type A. *Pharmacology, biochemistry and behavior*, 94(2), 234-238.

Bajohrs, M., Rickman, C., Binz, T., i Davletov, B. (2004). A molecular basis underlying differences in the toxicity of botulinum serotypes A and E. *European Molecular Biology Organization (EMBO) reports*, 5(11), 1090-1095.

Bartels, F., Bergel, H., Bigalke, H., Frevert, J., Halpern, J., i Middlebrook, J. (1994). Specific antibodies against the Zn (2+)-binding domain of clostridial neurotoxins restore exocytosis in chromaffin cells treated with tetanus or botulinum A neurotoxin. *Journal of biological chemistry*, 269(11), 8122-8127.

Bashford, J. A., Wickham, A., Iniesta, R., Drakakis, E. M., Boutelle, M. G., Mills, K. R., i Shaw, C. E. (2020). The rise and fall of fasciculations in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain communications*, 2(1), doi:10.1093/braincomms/fcaa018.

Botox. EMA (2003) <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/referrals/botox> (pristupljeno 22.2.2022.)

Brent, M. B., Lodberg, A., Thomsen, J. S., i Brüel, A. (2020). Rodent model of disuse-induced bone loss by hind limb injection with botulinum toxin A. *MethodsX*, 7, doi: 10.1016/j.mex.2020.101079.

Broide, R. S., Rubino, J., Nicholson, G. S., Ardila, M. C., Brown, M. S., Aoki, K. R., i Francis, J. (2013). The rat Digit Abduction Score (DAS) assay: a physiological model for assessing botulinum neurotoxin-induced skeletal muscle paralysis. *Toxicon*, 71, 18-24.

Brunt, J., Carter, A. T., Stringer, S. C., i Peck, M. W. (2018). Identification of a novel botulinum neurotoxin gene cluster in Enterococcus. *Federation of European Biochemical Societies (FEBS) letters*, 592(3), 310-317.

Caleo, M., Spinelli, M., Colosimo, F., Matak, I., Rossetto, O., Lackovic, Z., i Restani, L. (2018). Transynaptic action of botulinum neurotoxin type A at central cholinergic boutons. *Journal of neuroscience*, 38(48), 10329-10337.

Carter, R. J., Morton, J., i Dunnett, S. B. (2001). Motor coordination and balance in rodents. *Current protocols in neuroscience*, 15(1), 8-12.

Cruz, P. M. R., Cossins, J., Beeson, D., i Vincent, A. (2020). The neuromuscular junction in health and disease: molecular mechanisms governing synaptic formation and homeostasis. *Frontiers in molecular neuroscience*, 13, doi: 10.3389/fnmol.2020.610964.

Dhaked, R. K., Singh, M. K., Singh, P., i Gupta, P. (2010). Botulinum toxin: bioweapon & magic drug. *The Indian journal of medical research*, 132(5), 489-503.

Diener, H. C., Dodick, D. W., Aurora, S. K., Turkel, C. C., DeGryse, R. E., Lipton, R. B., ... i Brin, M. F. (2010). OnabotulinumtoxinA for treatment of chronic migraine: results from the double-blind, randomized, placebo-controlled phase of the PREEMPT 2 trial. *Cephalalgia*, 30(7), 804-814.

Dolly, J. O., Williams, R. S., Black, J. D., Tse, C. K., Hambleton, P., i Melling, J. (1982). Localization of sites for ¹²⁵I-labelled botulinum neurotoxin at murine neuromuscular junction and its binding to rat brain synaptosomes. *Toxicon*, 20(1), 141-148.

Dolly, J. O., Black, J., Williams, R. S., i Melling, J. (1984). Acceptors for botulinum neurotoxin reside on motor nerve terminals and mediate its internalization. *Nature*, 307(5950), 457-460.

Dolly, J. O., i O'Connell, M. A. (2012). Neurotherapeutics to inhibit exocytosis from sensory neurons for the control of chronic pain. *Current opinion in pharmacology*, 12(1), 100-108.

Dressler, D., Saberi, F. A., i Barbosa, E. R. (2005). Toxina botulínica: mecanismos de ação. *Arquivos de neuropsiquiatria*, 63(1), 180-185.

Dressler, D. (2012). Clinical applications of botulinum toxin. *Current opinion in microbiology*, 15(3), 325-336.

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

Drinovac, V., Bach-Rojecky, L., i Lacković, Z. (2014). Association of antinociceptive action of botulinum toxin type A with GABA-A receptor. *Journal of neural transmission*, 121(6), 665-669.

Duchen, L. W., i Strich, S. J. (1968). The effects of botulinum toxin on the pattern of innervation of skeletal muscle in the mouse. *Quarterly journal of experimental physiology and cognate medical sciences: translation and integration*, 53(1), 84-89.

Duchen, L. W. (1971). An electron microscopic study of the changes induced by botulinum toxin in the motor end-plates of slow and fast skeletal muscle fibres of the mouse. *Journal of the neurological sciences*, 14(1), 47-60.

Dürre, P. (2014). Physiology and sporulation in Clostridium. *Microbiology spectrum*, 2(4), 2-4.

Eleopra, R., Tugnoli, V., Quatralè, R., Rossetto, O., i Montecucco, C. (2004). Different types of botulinum toxin in humans. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 19(S8), 53-59.

Erbguth, F. J. (2004). Historical notes on botulism, Clostridium botulinum, botulinum toxin, and the idea of the therapeutic use of the toxin. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 19(S8), 2-6.

Freund, B., i Schwartz, M. (2003). Temporal relationship of muscle weakness and pain reduction in subjects treated with botulinum toxin A. *The journal of pain*, 4(3), 159-165.

Frontera, W. R., i Ochala, J. (2015). Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcified tissue international*, 96(3), 183-195.

Gill, D. M. (1982). Bacterial toxins: a table of lethal amounts. *Microbiological reviews*, 46(1), 86-94.

Goldstein, L. S., i Yang, Z. (2000). Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins. *Annual review of neuroscience*, 23(1), 39-71.

Habermann, E. (1974). 125 I-labeled neurotoxin from Clostridium botulinum A: preparation, binding to synaptosomes and ascent to the spinal cord. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 281(1), 47-56.

Han, J., Pluhackova, K., i Böckmann, R. A. (2017). The multifaceted role of SNARE proteins in membrane fusion. *Frontiers in physiology*, 8, doi: 10.3389/fphys.2017.00005.

Hatheway, C. L. (1988). Botulism. U: Balows, A., William Jr, J., Ohashi, M., & Turano, A. (ur.) Laboratory diagnosis of infectious diseases: principles and practice. Springer Science & Business Media, 111-133.

International clinical trials registry platform, WHO (2021) <https://trialsearch.who.int/?TrialID=EUCTR2011-005375-16-DK> (pristupljeno 22.2.2022.)

Jackman, R. W., i Kandarian, S. C. (2004). The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *American journal of physiology-Cell physiology*, 287(4), 834-843.

Jankovic, J. (2004). Botulinum toxin in clinical practice. *Journal of neurology, neurosurgery & psychiatry*, 75(7), 951-957.

Jayasinghe, I. D., i Launikonis, B. S. (2013). Three-dimensional reconstruction and analysis of the tubular system of vertebrate skeletal muscle. *Journal of cell science*, 126(17), 4048-4058.

Kedlaya, D. (2019) *Botulinum toxin*. Medscape. <https://emedicine.medscape.com/article/325451-overview#a1> (pristupljeno 22.2.2022.)

Keller, J. E., i Neale, E. A. (2001). The role of the synaptic protein snap-25 in the potency of botulinum neurotoxin type A. *Journal of biological chemistry*, 276(16), 13476-13482.

Kiernan, M. C., Vucic, S., Cheah, B. C., Turner, M. R., Eisen, A., Hardiman, O., ... i Zoing, M. C. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis. *The lancet*, 377(9769), 942-955.

Kim, Y. H., Back, S. K., Davies, A. J., Jeong, H., Jo, H. J., Chung, G., ... i Oh, S. B. (2012). TRPV1 in GABAergic interneurons mediates neuropathic mechanical allodynia and disinhibition of the nociceptive circuitry in the spinal cord. *Neuron*, 74(4), 640-647.

Kolb, B., i Whishaw, I. Q. (2021). *Fundamentals of human neuropsychology*. Macmillan, 389, 412, 391, 396, 445-452, 464, 505-518, 537, 538. (.epub inačica)

Kukreja, R. V., Sharma, S. K., i Singh, B. R. (2010). Molecular basis of activation of endopeptidase activity of botulinum neurotoxin type E. *Biochemistry*, 49(11), 2510-2519.

Lacković, Z. (2020). Botulinum Toxin and Pain. U: Whitcup, S. M., & Hallett, M. (ur.) Botulinum Toxin Therapy. Springer International Publishing, 251-264.

Ma, J., Elsaidi, G. A., Smith, T. L., Walker, F. O., Tan, K. H., Martin, E., ... i Smith, B. P. (2004). Time course of recovery of juvenile skeletal muscle after botulinum toxin A injection: an animal model study. *American journal of physical medicine & rehabilitation*, 83(10), 774-780.

Macdonald, T. E., Helma, C. H., Shou, Y., Valdez, Y. E., Ticknor, L. O., Foley, B. T., ... i Hill, K. K. (2011). Analysis of Clostridium botulinum serotype E strains by using multilocus sequence typing, amplified fragment length polymorphism, variable-number tandem-repeat analysis, and botulinum neurotoxin gene sequencing. *Applied and environmental microbiology*, 77(24), 8625-8634.

Macefield, V. G., i Knellwolf, T. P. (2018). Functional properties of human muscle spindles. *Journal of neurophysiology*, 120(2), 452-467.

Manuel, M., i Zytnicki, D. (2011). Alpha, beta and gamma motoneurons: functional diversity in the motor system's final pathway. *Journal of integrative neuroscience*, 10(03), 243-276.

Marchand-Pauvert, V., Aymard, C., Giboin, L. S., Dominici, F., Rossi, A., i Mazzocchio, R. (2013). Beyond muscular effects: depression of spinal recurrent inhibition after botulinum neurotoxin A. *The journal of physiology*, 591(4), 1017-1029.

Marvulli, R., Megna, M., Citraro, A., Vacca, E., Napolitano, M., Gallo, G., ... i Ianieri, G. (2019). Botulinum toxin type A and physiotherapy in spasticity of the lower limbs due to amyotrophic lateral sclerosis. *Toxins*, 11(7), doi: 10.3390/toxins11070381.

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

Matak, I., Bölcskei, K., Bach-Rojecky, L., i Helyes, Z. (2019). Mechanisms of botulinum toxin type A action on pain. *Toxins*, 11(8), doi: 10.3390/toxins11080459.

Matak, I., Riederer, P., i Lacković, Z. (2012). Botulinum toxin's axonal transport from periphery to the spinal cord. *Neurochemistry international*, 61(2), 236-239.

Matak, I., i Lacković, Z. (2014). Botulinum toxin A, brain and pain. *Progress in neurobiology*, 119, 39-59.

Matak, I. (2020). Evidence for central antispastic effect of botulinum toxin type A. *British journal of pharmacology*, 177(1), 65-76.

Matthews, C. C., Fishman, P. S., i Wittenberg, G. F. (2014). Tetanus toxin reduces local and descending regulation of the H-reflex. *Muscle & nerve*, 49(4), 495-501.

Mazzocchio, R., i Caleo, M. (2015). More than at the neuromuscular synapse: actions of botulinum neurotoxin A in the central nervous system. *The neuroscientist*, 21(1), 44-61.

McMahon, H. T., Kozlov, M. M., i Martens, S. (2010). Membrane curvature in synaptic vesicle fusion and beyond. *Cell*, 140(5), 601-605.

Miles, G. B., Hartley, R., Todd, A. J., i Brownstone, R. M. (2007). Spinal cholinergic interneurons regulate the excitability of motoneurons during locomotion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(7), 2448-2453.

Neurobloc. EMA (2021) <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/neurobloc> (pristupljeno 22.2.2022.)

NN 102/17 (2017): Zakon o zaštiti životinja. Narodne novine, 102/17

NN 155/13 (2013): Pravilnik o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe. Narodne novine, 155/13

Peck, M. W. (2009). Biology and genomic analysis of *Clostridium botulinum*. *Advances in microbial physiology*, 55, 183-320.

Pellizzari, R., Rossetto, O., Schiavo, G., i Montecucco, C. (1999). Tetanus and botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic uses. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological sciences*, 354(1381), 259-268.

Pirazzini, M., Rossetto, O., Eleopra, R., i Montecucco, C. (2017). Botulinum neurotoxins: biology, pharmacology, and toxicology. *Pharmacological reviews*, 69(2), 200-235.

Restani, L., Novelli, E., Bottari, D., Leone, P., Barone, I., Galli-Resta, L., ... i Caleo, M. (2012). Botulinum neurotoxin A impairs neurotransmission following retrograde transynaptic transport. *Traffic*, 13(8), 1083-1089.

Restani, L., Antonucci, F., Gianfranceschi, L., Rossi, C., Rossetto, O., i Caleo, M. (2011). Evidence for anterograde transport and transcytosis of botulinum neurotoxin A (BoNT/A). *Journal of neuroscience*, 31(44), 15650-15659.

Russell, W. M. S., i Burch, R. L. (1959). *The principles of humane experimental technique*. Methuen, 69-146.

Sakaguchi, G. (1982). *Clostridium botulinum* toxins. *Pharmacology i therapeutics*, 19(2), 165-194.

Sakamoto, T., Torii, Y., Takahashi, M., Ishida, S., Goto, Y., Nakano, H., ... i Kaji, R. (2009). Quantitative determination of the biological activity of botulinum toxin type A by measuring the compound muscle action potential (CMAP) in rats. *Toxicon*, 54(6), 857-861.

Scott, A. B. (1980). Botulinum toxin injection into extraocular muscles as an alternative to strabismus surgery. *Ophthalmology*, 87(10), 1044-1049.

Tsui, J. C., Stoessl, A. J., Eisen, A., Calne, S., i Calne, D. (1986). Double-blind study of botulinum toxin in spasmodic torticollis. *The lancet*, 328(8501), 245-247.

Wang, T., Martin, S., Papadopoulos, A., Harper, C. B., Mavlyutov, T. A., Niranjana, D., ... i Meunier, F. A. (2015). Control of autophagosome axonal retrograde flux by presynaptic activity unveiled using botulinum neurotoxin type a. *Journal of neuroscience*, 35(15), 6179-6194.

Weise, D., Weise, C. M., i Naumann, M. (2019). Central effects of botulinum neurotoxin—evidence from human studies. *Toxins*, 11(1), doi: 10.3390/toxins11010021.

Wess, J. (2003). Novel insights into muscarinic acetylcholine receptor function using gene targeting technology. *Trends in pharmacological sciences*, 24(8), 414-420.

Wiegand, H., Erdmann, G., i Wellhöner, H. H. (1976). 125 I-labelled botulinum A neurotoxin: pharmacokinetics in cats after intramuscular injection. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 292(2), 161-165.

Xeomin. EMA (2008) <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/referrals/xeomin> (pristupljeno 22.2.2022.)

Yam, M. F., Loh, Y. C., Tan, C. S., Khadijah Adam, S., Abdul Manan, N., i Basir, R. (2018). General pathways of pain sensation and the major neurotransmitters involved in pain regulation. *International journal of molecular sciences*, 19(8), doi: 10.3390/ijms19082164.

Yao, G., Lee, K., Gu, S., Lam, K. H., i Jin, R. (2014). Botulinum neurotoxin A complex recognizes host carbohydrates through its hemagglutinin component. *Toxins*, 6(2), 624-635.

Zagoraiou, L., Akay, T., Martin, J. F., Brownstone, R. M., Jessell, T. M., i Miles, G. B. (2009). A cluster of cholinergic premotor interneurons modulates mouse locomotor activity. *Neuron*, 64(5), 645-662.

Zhang, S., Masuyer, G., Zhang, J., Shen, Y., Lundin, D., Henriksson, L., ... i Stenmark, P. (2017). Identification and characterization of a novel botulinum neurotoxin. *Nature communications*, 8(1), 1-10.

8. ŽIVOTOPIS

Magdalena Matić rođena je 9.6.1997. godine u Zagrebu. Pohađala je opću, II. gimnaziju u Zagrebu, a 2016. upisala je Preddiplomski sveučilišni studij Biologija na Prirodoslovnomatemičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Ovim radom završava Diplomski sveučilišni studij Eksperimentalna biologija, modul Fiziologija i imunobiologija na istome fakultetu. Tijekom studija, iskustvo u radu u laboratoriju stjecala je prilikom laboratorijske stručne prakse u Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu, kao i u Laboratoriju za molekularnu neurofarmakologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu za potrebe izrade ovoga rada. S posterom *Metabolomics in pharmacology* sudjelovala je na 9. hrvatskom kongresu farmakologije s međunarodnim sudjelovanjem te je kao član povjerenstva sudjelovala u postupku reakreditacije Odjela za biologiju Sveučilišta u Osijeku 2021. godine.