

# Mjerenje antitijela na N-metil-D-aspartatni receptor u osoba s cervikalnom distonijom

---

Krka, Jakov

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:542184>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-30**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Jakov Krka**

**Diplomski rad**

**MJERENJE ANTITIJELA NA N – METIL – D – ASPARTATNI RECEPTOR  
U OSOBA S CERVIKALNOM DISTONIJOM**

**Akadska godina:**

**2023./2024.**

**dr. sc. Maja Rogić Vidaković**

**Split, srpanj 2024.**

## Sadržaj

1.	UVOD.....	1
1.1.	Cervikalna distonija .....	2
1.1.1.	Definicija .....	2
1.1.2.	Epidemiologija.....	3
1.1.3.	Klasifikacija.....	4
1.1.4.	Etiologija .....	6
1.1.5.	Klinička slika .....	9
1.1.6.	Dijagnoza.....	10
1.1.7.	Liječenje .....	13
1.1.8.	Ljestvice .....	17
1.2.	Biomarkeri.....	18
1.2.1.	Definicija .....	18
1.2.2.	Dijagnostički biomarkeri .....	19
1.2.3.	Monitorirajući biomarkeri .....	19
1.2.4.	Farmakodinamički biomarkeri.....	20
1.2.5.	Prediktivni biomarkeri.....	20
1.2.6.	Prognostički biomarkeri .....	21
1.2.7.	Biomarkeri sigurnosti.....	21
1.2.8.	Biomarkeri rizika .....	21
1.3.	NMDAR.....	22
1.3.1.	Struktura i fiziologija NMDAR .....	22
1.3.2.	NMDAR i bolesti .....	27
1.3.3.	Antitijela na NMDAR i cervikalna distonija .....	28
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA.....	30
3.	ISPITANICI I POSTUPCI.....	32
3.1.	Ispitanici.....	33
3.2.	Postupci i metode.....	34
3.3.	Statistička analiza .....	38
4.	REZULTATI.....	39
5.	RASPRAVA .....	44
6.	ZAKLJUČCI.....	48
7.	LITERATURA.....	50
8.	SAŽETAK .....	64

9. SUMMARY.....	67
10. ŽIVOTOPIS.....	70

## **Zahvale**

*Hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj ljubavi tijekom studiranja te što su mi bili stalna podrška za vrijeme moga školovanja.*

*Hvala mojim prijateljima na nesebičnom pomaganju i poticajima za svakodnevne napretke.*

*Zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Maji Rogić Vidaković na velikoj pomoći i strpljenju prilikom izrade ovog rada.*

*Zahvaljujem i izv. prof. dr. sc. Nikolini Režić Mužinić te izv. prof. dr. sc. Gordanu Džamonji na potpori i povjerenju tijekom izrade rada.*

## POPIS OZNAKA I KRATICA

DMRF – Fondacija za medicinsko istraživanje distonije (engl. *Dystonia Medical Research Foundation*)

CD – cervikalna distonija

REP – Projekt za epidemiologiju Rochestera (engl. *Rochester Epidemiology Project*)

NMDAR – N-metil-D-aspartat receptor

CASPR2 – Nalik proteinu povezanim s kontaktnom (engl. *Contactin-Associated Protein-like 2*)

LGI1 – Leucinom bogat gliomom inaktiviran (engl. *Leucine rich Glioma Inactivated 1*)

GABAR –  $\gamma$ -aminobutirična kiselina receptor (engl.  *$\gamma$ -Aminobutyric Acid Receptor*)

US – ultrazvuk (engl. *Ultrasound*)

BoNT/A – botulinum toksin A

AASLD – Američka udruga za istraživanje bolesti jetre (engl. *American Association for the Study of Liver Diseases*)

IDSa – Američko društvo za infektivne bolesti (engl. *Infectious Diseases Society of America*)

GRIN1 – N-metil-D-aspartat 1 ionotropni glutamatni receptor (*Glutamate Receptor, Ionotropic, N-Methyl-D-Aspartate 1*)

HRP – peroksidaza hrena (engl. *Horseradish Peroxidase*)

TMB – tetrametilbenzidin (engl. *Tetramethylbenzidine*)

OD – optička gustoća (engl. *Optical Density*)

## **1. UVOD**

## 1.1. Cervikalna distonija

### 1.1.1. Definicija

Povijest je distonije dugačka, tako je Oppenheim 1911. izvijestio o četirima mladim bolesnicima kojima je mišićni tonus bio hipotoničan u jednoj prilici, a u drugoj u toničnom mišićnom spazmu, obično, ali ne isključivo, izazvan voljnom pokretima zbog čega je skovao termin *dystonia musculorum deformans* (1). Oppenheimovi istovremenici Flatau i Sterling protivili su se terminu *distonija* smatrajući torzijske spazme glavnim kliničkim znakom bolesti te su predložili alternativni naziv progresivni torzijski spazam. Oppenheimov opis opstao je do danas, iako je fenomenološki zapis zadržao neke od značajki koje su izvještavali Flatau i Sterling (2).

1984. je Fondacija za medicinsko istraživanje distonije (engl. *Dystonia Medical Research Foundation*, DMRF) okupila odbor kojim se prvi put konsenzusno definirala distonija kao sindrom koji se sačinjava od kontinuiranih mišićnih kontrakcija, učestalo izazivajući torzijske i repetitivne pokrete ili abnormalna držanja (3).

Ispostavilo se da je DMRF – ova definicija manjkava te je međunarodni panel stručnjaka 2013. predložio da je distonija bolest poremećaja pokreta obilježena trajnim ili povremenim kontrakcijama mišića koje kao rezultat imaju abnormalne, često ponavljajuće, pokrete, držanja ili oboje. Distonični su pokreti obično s uzorkom, torzijski, a mogu biti popraćeni s tremorom. Distonija se često pokreće ili pogoršava voljnim pokretima te je povezana s prekomjernom aktivacijom mišića (2).

Cervikalne distonije imaju značajan negativni utjecaj na kvalitetu života bolesnika. Taj negativni utjecaj usporediv je s onim uočenim kod multiple skleroze, Parkinsonove bolesti i moždanog udara. Iako bolesnici s vratnom distonijom imaju poteškoća u fizičkim funkcijama, najlošije rezultate ostvaruju na polju mentalnoga zdravlja i emocionalnoga stanja u usporedbi s drugim neurološkim stanjima. To može biti posljedica anksioznosti, depresije i izolacije zbog neprepoznavanja, nerazumijevanja i nedostatka podrške za ovu bolest (4).



### 1.1.2. Epidemiologija

Prevalencija distonije je 601,1/1000000 od čega je cervikalna distonija najčešća s prevalencijom od 251,1/1000000, žena ima tri i pol puta više od muškaraca te je prosječna dob 63,8 (5). Podatci o incidenciji primarne cervikalne distonije sinkroni su, tako se cervikalna distonija na temelju Rochester epidemiološkog projekta (engl. *Rochester Epidemiology Project*, REP) kojim se pretraživalo medicinske kartone bolesnika pregledanih na Mayo klinici od 1950. do 1982. pojavljivala 10,9 puta na milijun ljudi po godini, primarne su fokalne distonije bile 12 puta češće od primarnih generaliziranih te je cervikalna distonija bila najčešća distonija (6). Prema ispitivanju koje je pregledalo Rochester registar od 1960. do 1979. Cervikalna distonija se pojavljivala 12 puta na milijun ljudi po godini (7). Novija studija provedena između 1997. i 1999. pokazala je incidenciju od 8 puta na milijun ljudi po godini (8).

Le Doux i sur. 2016. (9) izvještavaju da su na uzorku od 1000 bolesnika cervikalnom distonijom 95% bili bijelci te 75% bile žene. Prosječna dob početka bolesti bila je 45,5, a prosječno trajanje bolesti bilo je 14,6. U vrijeme procjene, 47,4% ljudi imalo je distoniju ograničenu na vrat, dakle izoliranu cervikalnu distoniju, u 21,1% zahvaćenost je bila ograničena na vrat, rame i proksimalne dijelove ruku. Preostalih 31,5% ispitanika imalo je šire anatomsko rasprostiranje. Od komorbiditeta najčešće se zamijetio tremor, laringealna distonija, depresija i anksioznost. Tremor se glave uočio kod 62% bolesnika. Tremor glave, laringealna distonija te psihički komorbiditeti (najčešće depresija i anksioznost) bili su češći u žena. Čak 32% ispitanika prijavljuje psihološke komorbiditete. Obiteljska anamneza distonije bila je prisutna u 14% ispitanika, Parkinsonove bolesti u 11% te tremora u 29% bolesnika (9). U pregledu od 266 bolesnika sa izoliranom cervikalnom distonijom iz jednog centra, 12% je imalo pozitivnu obiteljsku povijest distonije (10).

Važno je napomenuti da bolesnici s cervikalnom distonijom imaju značajno veću vjerojatnost da su imali dijagnozu traume u razdoblju od triju godina ranije, ili patologiju vrata u razdoblju od pet godina prije postavljanja dijagnoze. Tri godine prije dijagnoze, u bolesnika s cervikalnom distonijom značajno je češće dijagnosticiran tremor, esencijalni tremor, depresija i anksioznost. Važnost usmjeravanja pozornosti na cervikalnu distoniju je i u problematici odgođenoga postavljanja dijagnoze što predstavlja značajnu prepreku za primjenu odgovarajućeg liječenja bolesnika s distonijom, pri čemu čak 50% bolesnika potvrđuje

posljedice odgođenoga postavljanja dijagnoze. Postoji mnogo razloga za odgođeno postavljanje dijagnoze cervikalne distonije, uključujući: blage ili sporo progredirajuće simptome, fluktuiranje simptoma koje se ne vide tijekom posjeta liječniku, fokus liječnika na liječenje boli umjesto osnovnog uzroka boli i pogrešnu dijagnozu kao psihogenu bolest (11).

### **1.1.3. Klasifikacija**

Općenito se distonija klasificira prema dobi početka simptoma, vremenu pojave simptoma, anatomskoj distribuciji, pridruženim simptomima te etiologiji. Klasifikacija može biti važna jer može dati naznake o prognozi i načinu liječenja. Gledano prema raspodjeli, fokalna distonija zahvaća malu skupinu mišića u jednom dijelu tijela, segmentalna distonija zahvaća susjednu skupinu mišića, multifokalna uključuje skupine mišića koje nisu susjedne, generalizirana je distonija široko rasprostranjena, a hemidistonija zahvaća više tjelesnih regija ograničenih na jednu polovicu tijela. Primjeri su fokalne blefarospazam, oromandibularna distonija, cervikalna distonija, laringealna distonija i grč pisca. Primjeri su segmentalne kranijalna distonija i bibrachijalna distonija. Generalizirana distonija obično ima rani početak, a fokalna distonija obično počinje u odrasloj dobi. Tijek bolesti može biti statički ili progresivan. Iz toga proistječe da bolest može biti perzistentna, o akciji ovisna, s dnevnim fluktuacijama te paroksizmalna. Sama distonija može biti izolirana ili kombinirana. Etiološki može imati podlogu u patologiji živčanog sustava, naslijeđena ili stečena preko perinatalnih ozljeda mozga, infekcija, droga, toksina, vaskularnih incidenata, neoplazmi, trauma. Može biti idiopatski sporadična ili obiteljska. Većina bolesnika s vratnom distonijom ima početak u odrasloj dobi, pa je prema tome klasifikacija prema etiologiji najrelevantnija. Bolesnici s vratnom distonijom se prema etiologiji klasificiraju u dvije grupe: primarnu (idiopatska – može biti genetski uvjetovana ili sporadična) i sekundarnu (simptomatska) vratnu distoniju. Da bi bolesnik imao dijagnozu primarne vratne distonije, ne smije postojati nikakav dokaz iz anamneze, fizikalnog pregleda ili laboratorijskih nalaza (osim genetskih testova za distoniju) koji bi ukazivao na bilo koji sekundarni uzrok distoničnih simptoma. Stoga, mora postojati normalna perinatalna i rana anamneza razvoja, nema anamneze neurološke bolesti ili izloženosti lijekovima za koje se zna da uzrokuju sekundarnu distoniju (npr. fenotiazini). Također, moraju biti normalni intelektualni, piramidalni, cerebelarni i senzorni pregledi i dijagnostika. Bolesnici kod kojih se

uoče gore navedene abnormalnosti klasificiraju se kao oni sa simptomatskom ili sekundarnom vratnom distonijom (2,12,13).

### 1.1.4. Etiologija

Nasljedne ili hereditarne distonije nastaju zbog genskih mutacija koje se prenose s roditelja na djecu. Tablica 1 prikazuje nasljedne distonije, genetske uzroke, kromosomske lokuse, oblik nasljeđivanja te dodatne značajke (14).

**Tablica 1.** Fokalne distonije

Vrsta distonije[M1] [JK2]	Gen	Lokus	Novo ime & fenotipska podgrupa	Dodatne značajke	AD/AR	
Izolirana	<i>TOR1A</i>	DYT1	DYT-TOR1A	Počinje u djetinjstvu ili u odrasloj dobi, generalizirana	AD	
	<i>THAP1</i>	DYT6	DYT-THAP1	Počinje u odrasloj dobi, kranijalna ili generalizirana	AD	
	<i>ANO3</i>	DYT24	DYT-ANO3	Počinje u odrasloj dobi, fokalna ili segmentalna	AD	
	<i>GNAL</i>	DYT25	DYT-GNAL	Većinom počinje u odrasloj dobi, fokalna ili segmentalna	AD	
	<i>KMT2B</i>	DYT28	DYT-KMT2B	Rani početak, generalizirana, sindromske značajke	AD	
Kombinirana	Distonija + parkinsonizam	<i>GCH1</i>	DYT5a	DYT-GCH1	Odgovara na liječenje levodopom	AD, AR
		<i>TH</i>	DYT5b	DYT-TH	Odgovara na liječenje levodopom	AR
		<i>SPR</i>	Nije određeno	DYT-SPR	Odgovara na liječenje levodopom, kognitivne teškoće	AR
		<i>TAF1 1</i>	DYT3	DYT-TAF1	Neurodegeneracija	XL
		<i>PRKRA</i>	DYT16	DYT-PRKRA	Distonija s blagim parkinsonizmom	AR
	Distonija + mioklonus	<i>ATP1A3</i>	DYT12	DYT-ATP1A3	Rapidni početak	AD
		<i>SGCE</i>	DYT11	DYT-SGCE	Psihijatrijska bolest	AD
	Paroksizmalna distonija + druge diskinezije	<i>PNKD 2</i>	DYT8	PxMD-PNKD	Paroksizmalna diskinezija neinducirana pokretom	AD
		<i>PRRT2</i>	DYT10	PxMD-PRRT2	Paroksizmalna pokretom inducirana diskinezija	AD
		<i>SLC2A1</i>	DYT18	PxMD-SLC2A1	Paroksizmalna naporom inducirana diskinezija	AD
<i>ECHS1</i>		Nije određeno	PxMD-ECHS1	Paroksizmalna naporom inducirana diskinezija	AR	

*AD = autosomno dominantno, AR = autosomno recesivno, XL = s X – kromosomom povezano*

Etiologija vratne distonije je heterogena i najčešće idiopatska. Određivanje uzroka vratne distonije važno je za usmjerenje razvoja novih terapija. Većina pozornosti prethodnih istraživanja bila je usmjerena na genetske uzroke jer se procjenjuje da 10-20% bolesnika ima pogođenog člana obitelji (11). Tako je u jednom pregledu od 266 bolesnika s izoliranom cervikalnom distonijom iz jednog centra, 12% njih imalo pozitivnu obiteljsku povijest distonije (15).

Iako je većina slučajeva cervikalne distonije idiopatska, neki su slučajevi sekundarni, nastali nakon žarišnih lezija mozga. Lokacije su lezija bile heterogene. Cervikalna se distonija tradicionalno pripisivala disfunkciji bazalnih ganglija (16), ali su uočene abnormalnosti i u mnogim drugim regijama mozga, uključujući mali mozak (17), prefrontalni korteks (18), mesencephalon (19), motorički korteks (20) i somatosenzorni korteks (21). Pozitivna povezanost s malim mozgom i negativna povezanost sa somatosenzornim korteksom bili su specifični markeri cervikalne distonije u usporedbi s lezijama koje uzrokuju druge neurološke simptome. Povezanost s tim dvjema regijama definirala je jedinstvenu mrežu mozga koja je obuhvaćala heterogene lokacije lezija koje uzrokuju cervikalnu distoniju (22). Cervikalna distonija može nastati i sekundarno kao posljedica uzimanja antidopaminergičkih lijekova ili blokatora dopaminergičkih receptora (23).

Prema dosadašnjim nalazima genskih istraživanja, trenutno ipak ne postoje jasni uvidi da su genetički doprinosi cervikalnoj distoniji značajni. Patogene ili vjerojatno patogene strukturne varijante u THAP1, TOR1A i GNAL genu identificirane su 0,8% na studiji od 1000 bolesnika. Dva pojedinca imale su nove mutacije pogrešnoga čitanja (engl. missense) mutacije u egzonu 5 TOR1A gena. Sinonimne i nekodirajuće strukturne varijante u THAP1 i GNAL genu identificirane su kod 4% kohorte (24).

Jinnah 2019. naglašava da je od iznimne važnosti prepoznati dva oblika stečene distonije. Prvi je tardivna distonija uzrokovana lijekovima koji blokiraju dopaminske receptore, kao što su neuroleptici ili metoklopramid. Navedeni lijekovi češće izazivaju tardivnu diskineziju s karakterističnim ponavljajućim pokretima usta i jezika. Međutim, neki bolesnici razviju prvenstveno distonične manifestacije. Najčešće zahvaćeni dijelovi tijela uključuju kraniocervikalnu regiju ili lučno savijanje leđa prema natrag. Drugi oblik stečene distonije je funkcionalna (psihogena) distonija, koja može vrlo dobro oponašati organsku distoniju. Značajke koje upućuju na funkcionalnu distoniju uključuju netipične pokrete (težnja prema promjeni regija tijela ili primarnih zahvaćenih mišića tijekom vremena), nagli početak, atenuacija pokreta distrakcijom ili druga neobična prateća obilježja (25).

Nadalje, imunološki se mehanizmi sve više povezuju sa širokom lepezom bolesti poremećaja pokreta, bolesti poremećaja pokreta uobičajena su pojava u autoimunim poremećajima. Pored dobro poznatih imunološki posredovanih bolesti poremećaja pokreta, poput Sydenhamove koreje, postoji mnogo autoimunih poremećaja koji se manifestiraju različitim hiperkinetičkim i hipokinetičkim poremećajima, uključujući koreju, mioklonus i distoniju (26). U Siriratmanovoj metaanalizi od 2663 bolesnika s autoimunim encefalitisom, 40% ih je imalo neki oblik poremećaja pokreta. Od njih 53% je imalo anti - NMDAR antitijela, 33% anti - CASPR2 antitijela, 30% anti-LGI1 antitijela i 13% anti - GABAR antitijela. Diskinezija je bila najčešći poremećaj pokreta kod autoimunoga encefalitisa posredovanih anti – NMDAR antitijelima, a faciobrahijalni distonični napadi bili su najčešći kod autoimunoga encefalitisa posredovanog anti-LGI1 antitijelima (27). Izolirana kranio – cervikalna distonija može biti glavna manifestacija anti-NMDAR encefalitisa (28). Od raznih autoimunih poremećaja, čini se da su anti-IgLON5 antitijela često uzrok multiplih poremećaja pokreta, 87% bolesnika s antitijelima protiv IgLON5 ima barem jedan poremećaj pokreta, dok je medijan 3 (29). Poremećaji pokreta u vidu distonije mogu se pronaći i u neencefalopatskom Hashimotovom tiroiditisu (30).

Trauma je važan čimbenik u patogenezi vratne distonije u nekih bolesnika. Utvrđeno je da je povredu glave i vrata imalo 5% do 21% bolesnika s vratnom distonijom (14). Velickovic i sur. (25) u svojoj praksi prihvaćaju traumu kao pokretač distonije unutar razdoblja od 6 do 12 mjeseci nakon identificirane traume. U mnogih bolesnika, periferna ozljeda koja je prethodila distoniji bila je akutna, kratkotrajna i jasno definirana, kod nekih bolesnika ozljeda je bila relativno blaga, kronična ili repetitivna (25).

Perinatalna ozljeda mozga uzrokovana kernikerusom, hipoksično – ishemičnom encefalopatijom i moždanim udarom dovodi do oštećenja putamena i globusa palidusa oja su povezana s distonijom, ali su također otkrili da su lezije povezane s distonijom povezane sa zajedničkom strukturnom i funkcionalnom mrežom mozga koja uključuje motoričku koru mozga, dorzalni prednji cingulatni girus, duboku sivu masu i mali mozak (31).

Poremećaji pokreta mogu biti komplikacija infekcijskih bolesti. Infekcije koje se mogu manifestirati distonijom uključuju tuberkulozu, japanski encefalitis, streptokokne infekcije, virus varicella-zoster, subakutni sklerozirajući panencefalitis, dengue i neurocisticerkozu. U studiji Yadava i sur. (32) četvrti je bolesnik imao demenciju kao komplikaciju AIDS - a te je razvio cervikalnu distoniju nakon terapije risperidonom. Postoje razni predloženi mehanizmi infekcijski uvjetovane distonije, poput direktnog ili indirektnog neurotropnog učinka virusa, lezija, oportunističkih infekcija, neuroinflamacije, vaskulitisa, autofagije, disfunkcije sinapse i lijekova koji se koriste za liječenje infekcija (32).

Kod moždanog udara mogu se pojaviti hipokinetički i hiperkinetički poremećaji pokreta. Među njima, distonija se obično javlja u kroničnoj fazi moždanog udara. Iako je rijetko, akutna distonija može se manifestirati kao simptom akutnog ishemijskog moždanog udara ili se razviti tijekom hospitalizacije zbog ishemijskog moždanog udara (33).

Cervikalna distonija može nastati kao posljedica neoplazme kao što je navedeno u prikazu slučaja 48-godišnje žene s gliozom putamena i sfenoidnim krilnim meningeomom na lijevoj strani, koja je razvila distoniju ograničenu na cervikalnu regiju. Moguće objašnjenje incidenta je da je meningeom doveo do začepljenja lentikulostrijatalne grane srednje cerebralne arterije, što je uzrokovalo ishemiju ventralnog putamena i na kraju rezultiralo simptomatskom distonijom (34).

Kada se gleda na cervikalnu distoniju sa znanstvenoistraživačkog aspekta, dolazi se do istraživanja metaboloma cervikalne distonije kako bi se identificirali potencijalno abnormalni metaboliti ili poremećeni biološki putevi. Među biološkim putevima koji su značajno povezani

s cervikalnom distonijom, pet se odnosi na metabolizam ugljikohidrata, sugerirajući potencijalnu povezanost s proizvodnjom energije.

Tri puta odnose se na metabolizam lipida, koji stvara prostaglandine i druge metabolite poznate po posredovanju upalnih reakcija. Jedan zanimljiv metabolit identificiran kao potencijalno abnormalan kod cervikalne distonije je oksidirani lipid 2-hidroksidekanoat. Ovaj je metabolit identificiran i kod bolesnika s Parkinsonovom bolešću povezanom s mutacijama u genu parkin. Analiza puteva identificirala je 9 značajnih metaboličkih puteva povezanih s cervikalnom distonijom, uključujući: stvaranje prostaglandina iz dihomogama-linoleinske kiseline, put pentoznog fosfata, metabolizam arahidonske kiseline, metabolizam leukotriena, metabolizam škroba i saharoze, degradacija valina, leucina i izoleucina, metabolizam galaktoze, metabolizam fruktoze i manoze, metabolizam propanoata (35).

### **1.1.5. Klinička slika**

Jedan je od glavnih razloga u zakašnjoj dijagnostici distonije neznanje liječnika da se distonični pokreti mogu svrstati u dvije široke kategorije koje se često preklapaju. Abnormalni pokreti mogu biti spori i torzijski, pokatkad i s abnormalnim držanjem koje se čini kao fiksno, poput abnormalnoga držanja i spore, ali ponavljajuće devijacije glave kod vratne distonije ili kao torzijski pokreti stopala. Alternativno, distonični pokreti mogu biti brzi i trzavi, poput periokularnih grčeva blefarospazma, promjene u akustičnim karakteristikama glasa kod laringealne distonije i miokloničkih distonija. Kod nekih bolesnika, pokreti mogu biti brzi i ponavljajući, nalik tremoru. U tim slučajevima koristi se izraz distonični tremor. Iako se spori i torzijski pokreti lako prepoznaju, brzi i ponavljajući pokreti često su nezamijećeni. Bez obzira jesu li distonični pokreti spori ili brzi, postoji nekoliko tragova koji pomažu u prepoznavanju. Prvi je znak da distonični pokreti slijede obrazac. Ova karakteristika pomaže razlikovati koreju od distonije, gdje su pokreti slučajniji. Motorički tikovi također mogu imati svoje obrasce, ali se događaju uz premonitorne nagone (neugodne senzacije ili osjećaji što prethode tikovima koji se smanjuju pojedinim pokretom), a abnormalne se pokrete može voljno suzbiti.

Distoničnim pokretima obično nedostaje prethodnica i ne mogu se samo voljom suzbiti. Još jedna korisna razlika je da distonične pokrete obično izaziva ili pogoršava voljna akcija. U nekim slučajevima, distonija se pojavljuje samo sa specifičnim zadacima. Na primjer, bolesnici sa spisateljskim grčem mogu imati grčeve mišića šake, abnormalno držanje ili trzanje

pri pisanju, prilikom čega neće imati nikakvih poteškoća s drugim finim motoričkim vještinama kao što su pranje zuba, korištenjem vilice i noža te zakopčavanjem košulje. Bolesnici s distonijom glazbenika mogu imati poteškoće sa sviranjem jednog instrumenta, ali ne i drugog.

Čak i kada distonije nisu specifične za zadatak, većina će se pojačavati voljnim pokretima. Iako nije uvijek prisutna, identifikacija „geste antagonista“ (senzornog trika) također može biti vrlo koristan znak jer je jedinstvena za distoniju. Tipični primjeri uključuju dodirivanje donjeg dijela lica kod vratne distonije, dodirivanje gornjeg dijela lica kod blefarospazma ili stavljanje čačkalice u usta kod oromandibularne distonije. Bolesnike uvijek treba pitati čine li nešto da suzbiju svoje abnormalne pokrete jer ovi trikovi mogu biti vrlo neobični, a bolesnici ih ponekad ne navode. Naposljetku, kao i kod mnogih drugih neuroloških poremećaja, korisno je istaknuti da stres i umor pogoršavaju distoniju. Povećana učestalost depresije i anksioznosti javlja se kod mnogih tipova distonije. Prisutnost navedenih psiholoških teškoća često utječu na donošenje pogrešne dijagnoze distonije kao inducirane stresom ili kao dio navike (25).

### **1.1.6. Dijagnoza**

Dijagnoza izolirane cervikalne distonije temelji se na prisustvu potpornih te izostanku isključujućih kriterija. Potporni su kriteriji sljedeći:

- Zabilježena su barem dva abnormalna položaja vrata. Iako se kod bolesnika s izoliranom cervikalnom distonijom pokreti ili držanja mogu manifestirati u jednom smjeru ili položaju, češće bolesnici tijekom kliničkoga pregleda pokazuju više od jednoga abnormalnog položaja glave/vrata. Na primjer, neki bolesnici pokazuju rotaciju (tortikolis ili tortikaput) i nagib u suprotnom smjeru (laterokolis ili laterokaput).
- Vratni distonični pokreti obično imaju konzistentan smjer te su predvidljivi. Ovaj kriterij zahtijeva opažanje dviju ključnih značajki koje dijele gotovo svi distonični pokreti: održavanje smjera (pa i nakratko) te predvidljivost (iste su mišićne skupine ponavljano uključene). Ova obilježja primjećuju se i kada je prisutan tremor. Ipak, postoji manji broj bolesnika koji imaju više kaotične pokrete kojima nedostaje predvidljivosti.



- Prisutnost olakšavajućih manevara. Prisutni su u do 90% bolesnika s izoliranom cervikalnom distonijom ako se opažaju u gotovo 90% izoliranom cervikalnom distonijom bolesnika učinkoviti su u 40% (36). Blagi dodir brade, obraza ili vrata obično je dovoljan za ublažavanje simptoma (37).
- Bol se smanjuje injekcijom botulinum toksina u hiperaktivne mišiće (38). Bol je česta i patognomonična značajka izolirane cervikalne distonije, obično se ne javlja kod drugih žarišnih ili čak generaliziranih tipova distonije, a pogađa 75% bolesnika s izoliranom cervikalnom distonijom (39).
- Ako je prisutan tremor glave, detektira se nulta točka.
- Dob početka simptoma je između 30 i 70 godina.

Apsolutni isključujući kriteriji za izoliranu cervikalnu distoniju su:

- Jasna pojava dodatnih poremećaja pokreta (npr. mioklonička distonija), ataksija, znakovi bolesti piramidalnoga puta i drugi neurološki ili sustavni simptomi. Ako je tremor izrazito trzav, potrebno je istražiti prisutnost mioklonusa.
- Nerazjašnjeni mentalni invaliditet ili kognitivni poremećaj. Izolirana cervikalna distonija obično ne uzrokuje kognitivni pad.
- Paroksizmalna cervikalna distonija (iznenadne samoograničavajuće epizode distonije inducirane trigerom, izazvane okidačem s povratkom u prethodno neurološko stanje).
- Distonija s generaliziranom zahvaćenošću. Izolirana cervikalna distonija primarno pogađa mišiće vrata, a ne cijelo tijelo.

Dijagnoza bilo kojeg od imitatora izolirane cervikalne distonije. Prirođeni je mišićni tortikolis poremećaj novorođenčadi ili male djece kojega uzrokuje abnormalno skraćenje i fibroza specifičnih vratnih mišića. Najčešće se zahvati sternokleidomastoidni mišić s ipsilateralnim pomakom i kontralateralnom rotacije glave. Benigni paroksizmalni tortikolis opisuje se kao samoograničavajuće nedovoljno dijagnosticirano stanje dojenčadi. Obilježavaju ga periodi neuobičajenog, dugotrajnog položaja glave i vrata, prilikom kojih se glava naginje na jednu stranu. Epizode su često praćene izraženim autonomnim značajkama, razdražljivošću, ataksijom, apatijom i pospanošću. Glavna razlika od izolirane cervikalne distonije je paroksizmalna narav poremećaja. Atlantoaksijalna je subluksacija rijetka i potencijalno smrtonosna poremetnja

normalne okcipito-cervikalne anatomije koja je obično asimptomatska, ali može uzrokovati neodređenu vratnu bol, zatiljnu glavobolju ili povremeno intermitentnu kompresiju vratne kralježnične moždine. Rotatorna subluksacija povezana je sa specifičnim položajem koji treba spomenuti: nagib i okret („kao da sluša zemlju tragajući za crvom“).

- Vratni su tikovi motorički tikovi koji uključuju cervikalnu regiju. Uganuće vrata može nastati kao posljedica traume, kao što je trzajna ozljeda vrata, pada ili torzijskog pokreta kralježnice. Uganuće zahvaća ligamente koji su prenapregnuti izvan normalnih granica. Ono može nastati odjednom, kao kod trzajne ozljede vrata koji nastaje nakon sudara vozila odostraga ili polako tijekom vremena zbog lošeg držanja, posebno tijekom sjedenja. Sandiferov sindrom je rijetki paroksizmalni pokret leđa i vrata koji je često povezan s gastroezofagealnom refluksnom bolešću kod djece. Često dolazi do pogoršanja abnormalnog položaja odmah nakon obroka i poboljšanja između obroka. Neki roditelji opisuju intermitentne epizode tortikolisa koji se mijenjaju s jedne na drugu stranu tijekom obroka. Funkcionalna ili psihogena distonija može se različito prezentirati (40).

### 1.1.7. Liječenje

U osnovi postoje tri načina na koji se liječi cervikalna distonija. Intramuskularna injekcija botulinum toksinom, peroralni lijekovi i u nekim slučajevima, kirurgija. Mogu se koristiti zasebno ili u kombinaciji. Postoje četiri tipa botulinum toksina odobrena od strane američke Agencije za hranu i lijekove (*engl. Food and Drug Administration, FDA*), to su tri tipa botulinum toksina tipa A i jedan tipa B. Tip A su onabotulinumtoksinA, abobotulinumtoksinA, inkobotulinumtoksin A, tip B je rimabotulinumtoksinB. Najčešće nuspojave injekcije su poteškoće gutanja, bol i ponekad bol u vratu (41).

Botulinum toksin djeluje tako što sprječava živac da otpusti neurotransmitor acetilkolin na način da cijepa proteine potrebne za vezikularno otpuštanje neurotransmitora što uzrokuje smanjenu mišićnu kontrakciju (42). Djelovanje botulinum toksina na mišiće počinje otprilike 2 - 3 dana nakon injekcije, učinak je najjači nakon približno 4 tjedna, a olakšanje simptoma traje otprilike 2 - 6 mjeseci. Liječenje botulinum toksinom nije konačni lijek, već simptomatska terapija (43).

Američka je akademija neurologije (*engl. American Academy of Neurology*) 2016. u smjernicama postavila precizno izvedenu i dozom adekvatnu intramuskularnu injekciju botulinum toksina kao zlatni standard liječenja cervikalne distonije (44). Tsui i sur. (45) prvi su upotrijebili intramuskularnu injekciju botulinum toksina na 12 bolesnika za liječenje cervikalne distonije 1985. i 1986. Uočili su značajno smanjenje abnormalnih pokreta te poboljšanje boli (45). Od samog početka terapije botulinum toksinom za cervikalnu distoniju, ove injekcije izvode liječnici s poznavanjem anatomije ljudske cervikalne regije, čak i u slučaju distoničnih promjena veličine mišića i položaja glave. Među liječnicima postojalo je uvjerenje da će iskusni liječnik, na temelju vlastitoga iskustva ili preuzetog znanja, znati koje mišiće treba odabrati za liječenje i da ih može dovoljno precizno injicirati uz pomoć anatomskih orijentirnih točaka (46). No, s odmakom vremena uočilo se da sami fizikalni pregled cervikalne regije nije dostatan za ispravno uočavanje mišića zahvaćenih distonijom. U određenim situacijama može se koristiti i elektromiogram (EMG) za otkrivanje patološke aktivnosti kako bi se igla usmjerila na najbolje mjesto za davanje toksina. Nalazi studija sugeriraju da je teško otkriti sve involvirane mišiće u cervikalnoj distoniji na temelju samo fizikalnoga pregleda. Pored kliničkih mjerenja, promjena EMG aktivnosti zbog liječenja je pouzdana fiziološka mjera za evaluaciju odgovora na liječenje, simultani EMG tijekom terapije botulinum toksinom može biti koristan za otkrivanje zahvaćenih mišića (47).

Daljnijim razumijevanjem cervikalne distonije koristeći CT Gerhard Reichel i sur. (48) došli su do ColCap – koncepta kojim su složenu vratnu kralježnicu sa svojih 7 kralježaka sročili na 2 glavne funkcionalne jedinice. Prva funkcionalna jedinica odnosi se na pokrete u okcipito – atlanto – aksijalnom zglobu, a druga u donjem dijelu vratne kralježnice od C3-C7. Ovime se i došlo do zaključka da *m.obliquus capitis inferior* igra važnu ulogu u nastanku cervikalne distonije. (48) Nadalje, pedijatrijski neurolozi, neurolozi i anesteziolozi započeli su s intramuskularnom injekcijom botulinum toksina pod nadzorom ultrazvuka za djecu s cerebralnom paralizom (49) i za blokadu *plexus lumbalis* (50). Opisali su glavne značajke tehnike, kao što su tehnički preduvjeti, anatomiju te razlikovanje mete od okolnih struktura. Posljedično, Europski konsenzus 2009. o uporabi botulinum toksina na djeci s cerebralnom paralizom donio je zaključak da je injekcija botulinom toksina pod nadzorom ultrazvuka standard za djecu s cerebralnom paralizom (51) te za injiciranje lokalnih anestetika u blizini neuralnih struktura (52).

Schramm i sur. (53) zagovaraju pristup zasnovan na ultrazvuku da se manje oslanja na unaprijed utvrđene modele cervikalne distonije, a više na procjenu individualnoga distoničnog obrasca bolesnika. Zagovaraju rutinsku uporabu ultrazvuka kao orijentir za botulinum toksin injekcije. Navode da je prednost injekcija s nadzorom ultrazvuka neinvazivnost samoga ultrazvuka te prikaz mišića u realnom vremenu. To znači da se poboljšava preciznost injekcija i potencijalno ishodi liječenja, a također se izbjegavaju neželjeni učinci. Smatraju da druge metode imaju ograničenu vrijednost zbog visokih troškova, izloženosti zračenju ili nedostupnosti u kliničkoj praksi (53).

Prednosti ultrazvuka (US) u liječenju cervikalne distonije botulinum toksinom A (BoNT/A) su: točan odabir cilja (ultrazvuk omogućuje liječniku da jasno odredi one mišiće koji se trebaju liječiti botulinum toksinom), anatomske točne injekcije (lijek se može injicirati i u dublje mišiće), povećava se učinkovitost i sigurnost liječenja (veća točnost i ponovljivost terapije što dovodi do boljšeg učinka i sigurnosti dugotrajnoga liječenja), individualizirani protokoli injiciranja (liječenje uz pomoć ultrazvuka poboljšava anatomske znanje liječnika o zahvaćenim mišićima, kako s anatomske tako i funkcionalnog aspekta, to omogućuje izradu personaliziranih protokola injiciranja za svakog bolesnika), analiza složenih slučajeva. Kombiniranje ultrazvuka s EMG-om (elektromiografijom) otvara put analizi složenih kliničkih slika cervikalne distonije koje često ne reagiraju na standardne protokole liječenja (54).

FDA trenutno ne odobrava nijedan peroralni lijek kao terapiju distonije. Peroralni se lijekovi ipak rabe počevši od antikolinergika preko baklofena i benzodiazepina te dopaminergika do antagonista dopaminskih receptora (55). Antikolinergici su općenito najuspješnija oralna terapija za liječenje distonije, a triheksifenidil je najčešće korišten lijek (56). Triheksifenidil je antagonist muskarinskog acetilkolinškog receptora (57). Centralne nuspojave uključuju gubitak pamćenja, konfuzno stanje, nemir, nesanicu i noćne more. Kod djece može se pojaviti koreja ili pogoršanje prethodno postojećeg tika. Periferni neželjeni učinci uključuju zamagljeni vid, suha usta, zatvor i retenciju urina. Kapljice za oči i oralni piridostigmin mogu se koristiti za borbu protiv perifernih nuspojava (58). Baklofen je lijek koji djeluje na presinaptičke receptore  $\gamma$  - aminobutirične kiseline (GABA) i uglavnom se koristi za liječenje spasticiteta. Točan mehanizam njegovog djelovanja u tretmanu distonije još nije potpuno razjašnjen (59). Benzodiazepini se često propisuju za distoniju, iako njihova učinkovitost nije potvrđena velikim, kontroliranim studijama. Klonazepam se koristi najčešće. U jednoj otvorenoj studiji, klonazepam i drugi benzodiazepini pokazali su se učinkovitim kod 16% bolesnika s različitim oblicima distonije (60). Levodopa se koristila za liječenje generalizirane distonije u nekoliko ranijih studija, ali su rezultati bili proturječni. Neki su izvijestili o poboljšanju (61,62), dok su drugi izvijestili o pogoršanju (63,64).

Također su istraživani i drugi dopaminergični agensi poput bromokriptina, apomorfina i lizurida s različitim rezultatima (65).

S obzirom na to da antipsihotici mogu potencijalno izazvati tardivnu diskineziju i tardivnu distoniju (66), paradoksalno je da mogu biti korisni u liječenju distonije. Iako su neki prikazi slučajeva i serije slučajeva potvrdili korisnost tipičnih antipsihotika u liječenju određenih tipova distonije, većina kliničkih ispitivanja dala je inkonkluzivne rezultate (65). Također je prijavljeno da su neki atipični antipsihotici (npr. kvetiapin i risperidon) učinkoviti u liječenju primarne distonije (67). Klozapin je atipični antipsihotik koji zaslužuje posebnu pozornost (68).

Selektivna denervacija zahtijeva pravilnu identifikaciju mišića uhvaćenih cervikalnom distonijom, a zatim se provodi periferna ili ekstraspinalna selektivna denervacija samo tih mišića. Odabir bolesnika je ključan za uspjeh ove procedure. Bolesnici kod kojih se razvio fiksiran položaj kao posljedica fibroze mišića ili degeneracije kralježnice slabo reagiraju na liječenje. Prisutnost više od jednog primarnog pokreta (npr. tortikolis i laterokolis) također ograničava uspjeh selektivne denervacije. Optimalni rezultati postižu se kod bolesnika s jasnim rotacijskim tortikolisom, laterokolisom, retrorotacijskim tortikolisom i retrokolisom (69).

Intratekalna baklofenska terapija (ITB) se prvi put koristila za liječenje distonije 1991. godine (70). Teoretski, ova metoda može smanjiti centralne nuspojave povezane s oralnim unosom baklofena. Iako su neki izvještaji pokazali njezinu učinkovitost u liječenju primarne i sekundarne distonije (71), dostupni podaci nisu konzistentni. Trenutno se najčešće koristi kod bolesnika s distonijom kombiniranom sa spastičnošću donjih udova, kao što se vidi kod cerebralne paralize. Moguće komplikacije uključuju infekciju, curenje likvora, neispravnost katetera i pumpe (što može dovesti do apstinencijske krize) i predoziranje (72). Upotreba ablativnih procedura, poput palidotomije i talamotomije, za liječenje bolesti poremećaja pokreta prisutna je još od 1940-ih. Iako su ove procedure mogle biti učinkovite u liječenju različitih tipova distonije, većinom ih je zamijenile duboka mozgovna stimulacija (engl. *deep brain stimulation, DBS*). DBS ima nekoliko prednosti u odnosu na ablativne procedure. Zbog svoje nedestruktivnosti, DBS je reverzibilan i podesiv (73). Također se može sigurno provoditi bilateralno bez rizika od trajnih govornih ili kognitivnih deficita koji su prijavljeni kod bilateralnih ablativnih procedura (74).

### 1.1.8. Ocjenske ljestvice u cervikalnoj distoniji

Tsui i sur. (75) te Stell i sur. (75) su 1980-ih razvili relativno kratku bodovnu ljestvicu za procjenu cervikalne distonije (75). Radi se o ljestvici koja ocjenjuje amplitudu i trajanje održanog položaja te povremenih pokreta glave, kao i prisutnost elevacije ramena i tremora.

Rotacija, nagib glave te antekolis/retrokolis spadaju u podskalu amplitude održanoga položaja te se ocjenjuju na skali od 0 do 3. Podskala trajanja održanoga položaja dijeli se na povremeno i stalno održavanje položaja prilikom čega se povremenom dodjeljuje 1 bod, dok se stalnom daju 2 boda. Dodatno, podskala tremora glave ocjenjuje se i po težini i po trajanju s 1 do 2 boda. Naposljetku, podskala elevacije ili depresije ramena ocjenjuje se od 0 do 3. Množenjem broja bodova za težinu s trajanjem tremora dobiva se ocjena za podskalu tremora glave. Množenjem broja bodova za trajanje s brojem bodova za amplitudu održanih pokreta zajedno sa zbrajanjem ocjene za tremor i elevacijom/depresijom ramena dobiva se ukupan mogući broj bodova od 25 (75).

#### (A) Amplituda održanih pokreta

Rotacija: 0 = nije prisutna, 1 =  $< 15^\circ$ , 2 = 15-30°, 3 =  $> 30^\circ$ .

Nagib: 0 = nije prisutan, 1 =  $< 15^\circ$ , 2 = 15-30°, 3 =  $> 30^\circ$ .

Antekolis/retrokolis: = nije prisutan, 1 = blag, 2 = umjeren, 3 = težak.

Kombinirana ocjena = A.

#### (B) Trajanje održanih pokreta

1 = povremeno, 2 = trajno.

#### (C) Elevacija ramena

0 = nije prisutna, 1 = blaga i povremena,

2 = blaga i stalna, ili teška i povremena,

3 = teška i stalna.

#### (D) Tremor

Težina: 1 = blagi, 2 = teški.

Trajanje: 1 = povremeni, 2 = kontinuirani.

Težina x trajanje = D.

#### (E) Sveukupna ocjena = [(A) x (B)] + (C) + (D). (76)

Razvitek ljestvica za bolje razumijevanje utjecaja cervikalne distonije na zdravlje nastavio se s razvojem TWSTRS skale (engl. *Toronto Western Spasmodic Torticollis Rating*

*Scale*) koja je kompozitna skala koja pokriva različite aspekte cervikalne distonije. Skala se sastoji od triju dijelova, težina, prvi dio temelji se na rezultatima fizikalnoga pregleda (podskala težine), invalidnost, drugi dio ocjenjuje razinu nesposobnosti koju osoba ima zbog distonije, treći dio ocjenjuje bol. Podskala težine sastoji se od sljedećih stavki: maksimalno odstupanje (rotacija, nagib, lat. antecollis/retrocollis, lateralni pomak, sagitalni pomak), čimbenik trajanja, utjecaj senzoričkih trikova, elevacija ramena/prednji pomak ramena, opseg pokreta (bez pomoći senzoričkih trikova), vrijeme (koliko bolesnik može držati glavu unutar 10° od neutralnog položaja bez pomoći senzoričkih trikova). Zbroj bodova svake stavke pojedinačno daje maksimalni rezultat od 35, pri čemu se faktor trajanja boduje dvostruko. Podskala nesposobnosti sastoji se od šest stavki koje ocjenjuju kako cervikalna distonija utječe na svakodnevni život. Tih šest stavki su rad (posao ili kućni poslovi), svakodnevne životne aktivnosti (hranjenje, oblačenje, higijena), vožnja, čitanje, gledanje televizije, aktivnosti izvan kuće. Svaka se stavka ocjenjuje od 0 = nema poteškoće do 5 = najveći stupanj invalidnosti. Podskala boli sastoji od ocjene uobičajene, najgore i najbolje boli u proteklom tjednu, trajanju boli i koliko bol utječe na nesposobnost. Ukupni rezultat ove podskale je između 0 i 20, s tim da se 20 bodova daje za najveći mogući osjećaj boli (77).

Profil utjecaja cervikalne distonije - 58 (*i. Cervical Dystonia Impact Profile – 58, CDIP - 58*) je pouzdana i valjana skala te izrazito opsežna ljestvica za procjenu koja mjeri utjecaj cervikalne distonije na zdravlje u osam dimenzija (78). Stavke uključuju simptome glave i vrata, bol i neugodu, aktivnosti gornjega uda, hodanje, spavanje, smetanje, raspoloženje, psihosocijalno funkcioniranje (79).

## **1.2. Biomarkeri**

### **1.2.1. Definicija**

Definicija biomarkera je na prvi pogled vrlo jednostavna: "Definirana značajka koja se mjeri kao pokazatelj ili indikator normalnih bioloških procesa, patoloških procesa ili odgovora na izloženost ili intervenciju". (80) Iako naizgled jasno definirano, biomarkere treba razlikovati od procjene kliničkih ishoda (*engl. clinical outcome assessment, COA*) što je izravna mjera kako se osoba osjeća, funkcionira ili preživljava (81).



### 1.2.2. Dijagnostički biomarkeri

Dijagnostički biomarkeri otkrivaju ili potvrđuju prisutnost bolesti ili stanja od interesa, ili identificiraju osobu s određenim podtipom bolesti (80). Jedan je od ciljeva definirati metodu validacije koja osigurava da se biomarker može pouzdano, precizno i ponovljivo mjeriti po niskoj cijeni. Složenost validacije biomarkera može se uočiti u primjeni troponina, važnog biomarkera za dijagnosticiranje akutnog infarkta miokarda. Štoviše, dok je pojava visokosenzitivnih analiza troponina otvorila mnoge mogućnosti za sofisticiranu dijagnostiku malih epizoda miokardne nekroze, stvorila je i dodatnu pomutnju na ovom području. Kada se pojave male elevacije troponina na razinama koje su ranije bile neodredive, kliničke posljedice nisu jasne. Može se očekivati da će poboljšanjem metoda mjerenja također evoluirati i razumijevanje vrijednosti individualnih dijagnostičkih biomarkera. Na primjer: kod bolesti s niskom prevalencijom, poput raka gušterače ili jajnika, gdje je nova dijagnoza psihološki opterećujuća ili bi zahtijevala invazivnu evaluaciju, biomarker mora imati vrlo nisku stopu lažno pozitivnih rezultata. S druge strane, u probiru za češće bolesti kao što su hipertenzija ili hiperlipidemija kod kojih se mogu provoditi ponovljeni pregledi s malo rizika, više lažno pozitivnih rezultata može se tolerirati (82).

### 1.2.3. Monitorirajući biomarkeri

Monitorirajući je biomarker mjerljivi pokazatelj koji se može pratiti tijekom vremena da se ocijeni medicinsko stanje u svrhu utvrđivanja izlaganja lijeku, polutantu ili za otkrivanje učinka lijeka ili biološkog agensa (82). Monitorirajući biomarkeri imaju značajnu ulogu u kliničkoj medicini. Primjena monitorirajućih biomarkera ogleda se u polju onkologije gdje se PSA te mjere kao PSA – vrijeme udvostručenja (engl. *PSA – doubling time*) može koristiti za ocjenu stanja bolesti nakon prethodno provedene radikalne prostatektomije ili radioterapije (83). Nadalje, CA 125 može se koristiti za praćenje terapije ili praćenje bolesti nakon terapije u bolesnika s rakom jajnika. Gundogdu i sur. (85) dokazali su da se vrijednosti u serumu CA 125 i ekspresija u tkivu CA 125 može upotrijebiti za predviđanje ranoga povratka ili rekurencije raka jajnika (84). Osim u polju onkologije, monitorirajući su biomarkeri prisutni u infektologiji gdje se prema smjernicama Američke udruge za istraživanje bolesti jetre (engl. *the American association for the Study of Liver diseases, AASLD*) te Američkoga društva za infektivne bolesti

(engl. *Infectious Diseases Society of America, IDSA*) razina ribonukleinske kiseline hepatitis C virusa upotrebljava u svrhu ocjene odgovora na terapiju u bolesnika s kroničnim hepatitisom C (85). Navise, ribonukleinska kiselina virusa humane imunodeficijencije, HIV – RNA, (engl. *Human Immunodeficiency Virus, HIV*) koristi se kao procjena učinkovitosti antiretroviralne terapije (86).

Monitorirajući biomarkeri služe i za mjerenje farmakodinamičkih učinaka. Klasični primjer farmakodinamičkoga mjerenja je internacionalni normalizirani omjer koji se koristi za određivanje doze antikoagulansa varfarina (87).

#### **1.2.4. Farmakodinamički biomarkeri**

Farmakodinamički su biomarkeri molekularni pokazatelji učinka lijeka na metu u organizmu. Farmakodinamički biomarker može se koristiti za ispitivanje veze između režima liječenja, učinka na metu i biološkog odgovora tumora. Vrlo je upotrebljiv i u kliničkoj medicini i u ranim fazama razvoja lijeka. Npr. ako nema sniženja tlaka nakon primjene ACEi (engl. *angiotensin – convertase - enzyme inhibitors*) vrijeme je za prelazak na drugu terapiju (82,88).

#### **1.2.5. Prediktivni biomarkeri**

Prediktivni biomarker definira se otkrićem da njegova prisutnost ili promjena predviđa pojedinca kod kojega je vjerojatnija povoljna ili nepovoljna reakcija na izloženost lijeku ili čimbeniku okoline (82). Onkološki gledano, planocelularni karcinom pluća jest prediktivni biomarker gdje se ne treba koristiti pemetreksed kao terapija. Pokazalo se da je stopa preživljenja lošija u terapiji pemetreksedom u usporedbi sa standardnom kemoterapijom docetakselom ili cisplatinom u kombinaciji s gemcitabinom (89). Genetički, (HLA) – B\*5701 je prediktivni biomarker za evaluaciju bolesnika s virusom humane imunodeficijencije da se identificiraju oni s visokim rizikom za toksičnu epidermalnu nekrolizu kao nuspojavu terapije abakavirom (90).

### **1.2.6. Prognostički biomarkeri**

Definicija prognostičkoga biomarkera je pokazatelj što se koristi za procjenu vjerojatnosti kliničkoga incidenta, ponovne pojave ili pogoršanja bolesti u bolesnika koji već imaju tu bolest ili medicinsko stanje. (91) Razlika od prediktivnih biomarkera je u tome što oni identificiraju čimbenike povezane s učinkom intervencije ili izloženosti. Prognostički biomarkeri su povezani s različitim ishodima bolesti, dok prediktivni biomarkeri razlučuju one koji će reagirati na terapiju od onih koji neće (82). Primjer je prognostičkoga biomarkera ukupni volumen bubrega da se odaberu bolesnici s autosomno dominantnom policističnom bolešću bubrega s visokim rizikom za progresivno opadanje bubrežne funkcije (92). Gleasonov se zbroj može rabiti kao prognostički biomarker da se odredi vjerojatnost progresije raka prostate (93).

### **1.2.7. Biomarker sigurnosti**

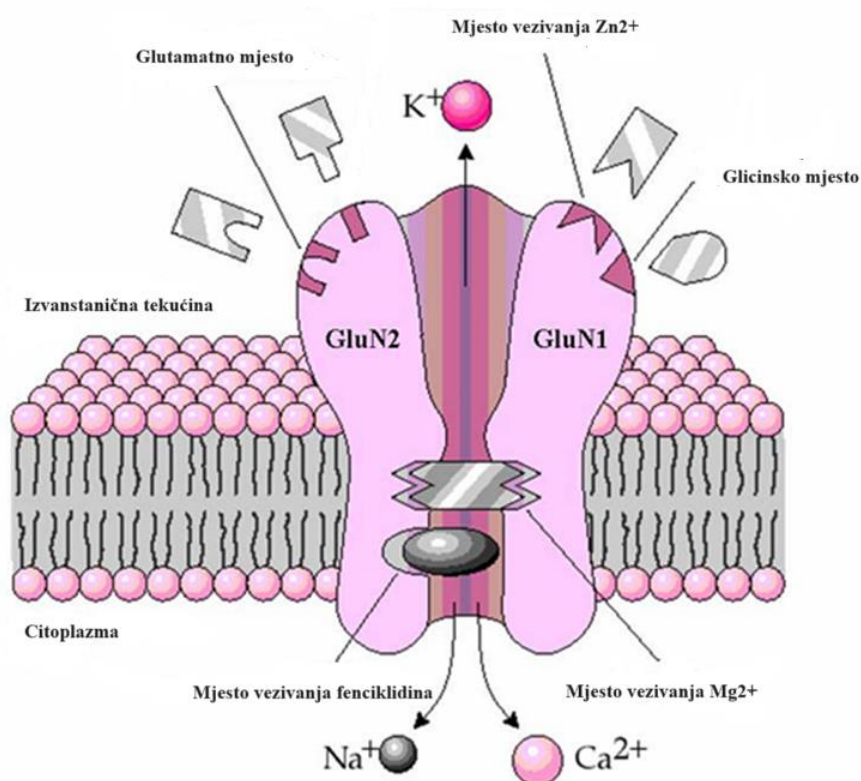
Biomarker sigurnosti koji se mjeri prije ili poslije izloženosti lijeku ili čimbeniku okoliša kako bi se pokazala vjerojatnost, prisutnost ili stupanj toksičnosti kao neželjenoga učinka (94). Jetrene transaminaze i bilirubin mogu se koristiti kao biomarkeri sigurnosti kada se procjenjuje potencijalna hepatotoksičnost (95). Razina kreatinina u serumu može se upotrijebiti kao biomarker sigurnosti za lijekove koji utječu na bubrežnu funkciju za monitoriranje nefrotoksičnosti (96). Korigirani QT interval (QTc) rabi se za procjenu vjerojatnosti da neki lijek izazove *torsades de pointes* (97).

### **1.2.8. Biomarker osjetljivosti ili rizika**

Pokazatelj koji ukazuje na potencijal za razvoj bolesti ili medicinskog stanja u pojedinca koji trenutno nema klinički vidljive bolesti ili stanja klasificira se kao biomarker osjetljivosti ili rizika. Po tome je sličan prognostičkim biomarkerima, osim što je u svojoj osnovi biomarker rizika problem povezan s razvojem bolesti, a ne s prognozom nakon što je bolest već postavljena (82).

## 1.3. NMDAR

### 1.3.1. Struktura i fiziologija N – metil – D – aspartat receptora



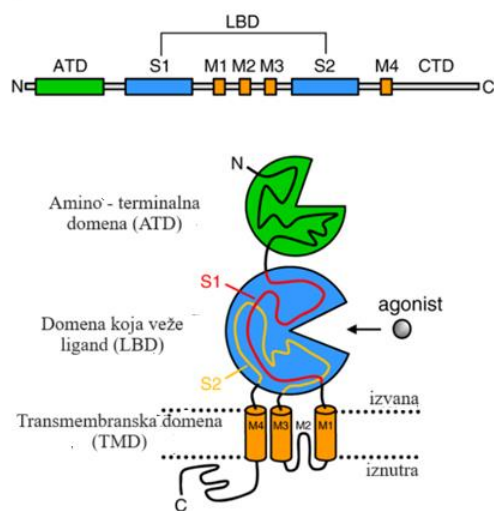
**Slika 1.** Shematski prikaz NMDA receptora.

Preuzeto i prilagođeno iz: Mor A, Grossman Y. High pressure modulation of NMDA receptor dependent excitability. *European Journal of Neuroscience*. 2007;25:2045–52.

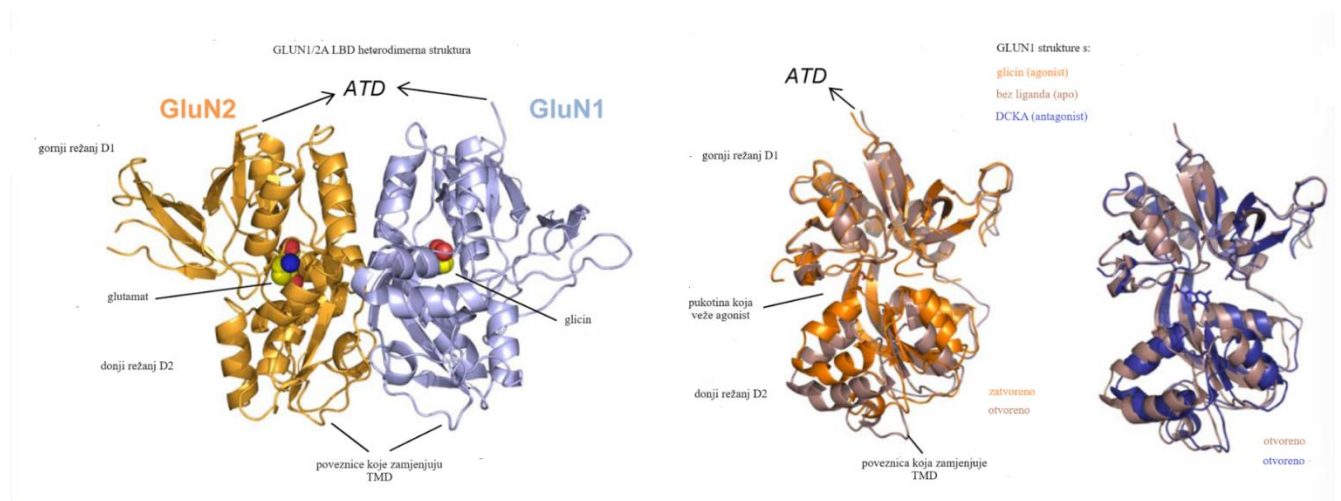
Većina se ekscitacijskog prijenosa signala u središnjem živčanom sustavu sisavaca odvija posredovanjem glutamata. Glutamat ekscitacijsku neurotransmisiju ostvaruje vezanjem na metabotropne glutamatne receptore (*engl. metabotropic glutamate receptor, mGluR*) i ionotropne glutamatne receptore (*engl. ionotropic glutamate receptor, iGluR*). iGluR su podijeljeni u različite funkcionalne klase, i to  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolopropionske kiseline (AMPA) receptore, kainatne receptore, N-metil-D-aspartat (NMDA) receptore i GluD receptore (također poznate kao delta ili  $\delta$  receptori) (98). NMDA

receptori glutamatom su posredovani ionski kanali visokopropusni za kalcij. Paolleti i sur. (99) navode da NMDA receptor nije uniformna jedinica već da se postoji više različitih podtipova NMDA receptora s različitim svojstvima što je vidno na Slici 1. Strukturno je NMDA receptor heterotetramer koji se sastavlja kombiniranjem osam različitih GluN1 podjedinica, četiri različite GluN2 podjedinice te dvije različite GluN3 podjedinice (99). Način nastanka podjedinica iGluR prikazan je na Slici 2. Prikaz različitih podjedinica vidljiv je na slici 3.

Sastav podjedinica razlikuje se u različitim regijama središnjeg živčanog sustava tijekom razvoja i u stanjima bolesti. Disfunkcije NMDA receptora upletene su u razne neurološke i psihijatrijske poremećaje, uključujući moždani udar, patološki bol, neurodegenerativne bolesti i shizofreniju (100).



**Slika 2.** Linearni reprezentat polipeptidnoga lanca u iGluR podjedinicama. Preuzeto i prilagođeno iz: Hansen KB, Yi F, Perszyk RE, Menniti FS, Traynelis SF. NMDA Receptors in the Central Nervous System. *Methods Mol Biol.* 2017;1677:1-80.

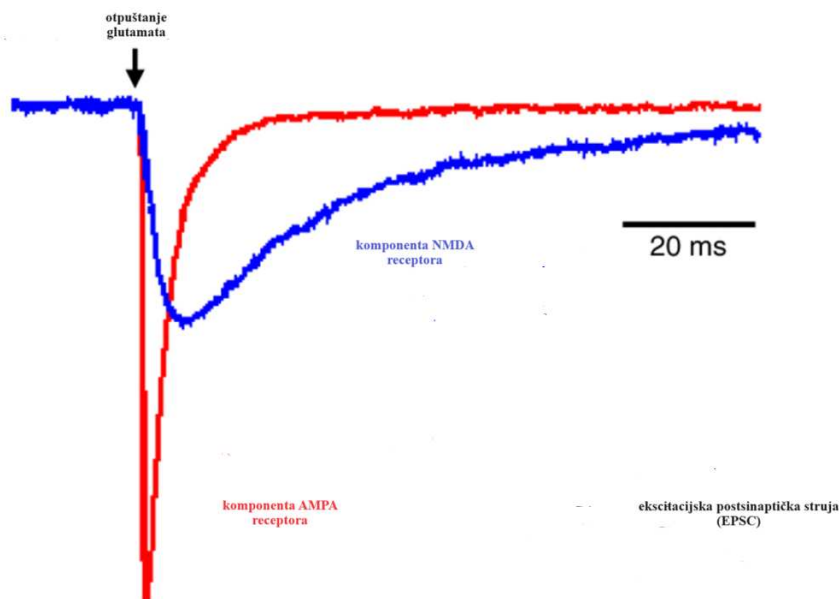


**Slika 3.** Kristalna struktura GLUN1/2A LBD heterodimera i GLUN1. Hansen KB, Yi F, Perszyk RE, Menniti FS, Traynelis SF. NMDA Receptors in the Central Nervous System. *Methods Mol Biol.* 2017;1677:1-80.

Aktivacija NMDA receptora sastavljenih od GluN1/GluN2 podjedinica zahtijeva dvije molekule koagonista glicina i dvije molekule agonista glutamata (100,101). NMDA receptori sastavljeni od GluN1/GluN3 zahtijevaju samo glicin za aktivaciju (102).

Dvije GluN3 podjedinice bile su posljednje podjedinice NMDA receptora klonirane prije otprilike 15 godina. Isprva se smatralo da su dominantno-negativni modulatori klasičnih NMDA receptora sastavljenih od GluN1 i GluN2 podjedinica. Međutim, GluN3 podjedinice u odsutnosti GluN2 podjedinica iznenađujuće se spajaju s GluN1 u ekscitatorne glicinske receptore (103,104). NMDA receptori pokazuju o naponu ovisnu blokadu magnezijevim ionima ( $Mg^{2+}$ ), visoku propusnost za kalcijeve ione ( $Ca^{2+}$ ) i zahtijevaju simultano vezanje koagonista glicina i glutamata za aktivaciju. Ove karakteristične osobine razlikuju NMDA receptore od AMPA/kainatnih receptora (tj. ne-NMDA receptora) i imaju značajan utjecaj na njihove fiziološke uloge u centralnom živčanom sustavu. (105).

U većini sinapsi središnjega živčanog sustava, otpuštanje glutamata aktivira ekscitacijske postsinaptičke struje (*engl. excitatory postsynaptic current, EPSC*) preko aktivacije AMPA i NMDA receptora. Slika 4. prikazuje da aktivacija AMPA receptora posreduje brzu komponentu s brzim rastom i padom, dok aktivacija NMDA receptora posreduje sporiju komponentu sa sporijim vremenom porasta i vremenskim tijekom koji traje desetke do stotine milisekundi (106, 107). Aktivacija postsinaptičkih kainatnih receptora obično rezultira EPSC - ovom sporijim vremenskim tijekom od AMPA receptora i usporedivim, ali uobičajeno bržim vremenskim tijekom od NMDA receptora (108).



**Slika 4.** Elektrofiziologija glutamata, NMDA i AMPA receptora. Preuzeto i prilagođeno iz: Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev.* 2010;62:405-96.

Kod potencijala membrane u mirovanju, ionski kanal NMDA receptora blokiraju fiziološke razine izvanstaničnoga  $Mg^{2+}$ . Međutim, sinaptičko otpuštanje glutamata i posljedična brza aktivacija AMPA/kainatnih receptora mogu depolarizirati potencijal membrane i time ukloniti blokadu ovisnu o naponu posredovanju  $Mg^{2+}$  NMDA receptora (109, 110). Stoga, NMDA receptori služe kao detektori koincidencije koji zahtijevaju simultano presinaptičko otpuštanje glutamata i postsinaptičku depolarizaciju kako bi proizveli sporu  $Ca^{2+}$ -propusnu komponentu EPSC-a (111).

NMDA receptori mogu posredovati značajnu infuziju  $Ca^{2+}$  tijekom EPSC-a zbog svoje visoke propusnosti za  $Ca^{2+}$  i produženog vremenskog tijeka. Povećanje intracelularnog  $Ca^{2+}$  koje nastaje može potaknuti više nizvodnih signala u postsinaptičkom neuronu, koji su središnji za uloge NMDA receptora u normalnim i patofiziološkim uvjetima (112). Povećanje intracelularnog  $Ca^{2+}$  pokreće kratkotrajne i dugotrajne učinke, koji su praćeni promjenama u sinaptičkoj učinkovitosti i neuronskoj morfologiji (tj. sinaptičkoj plastičnosti) (113). Veliki utok  $Ca^{2+}$  posredovan NMDA receptorom koji kratko traje može dovesti do dugoročne potencijacije (*engl. long – term potentiation, LTP*) sinaptičke učinkovitosti, dok manje izraženi utok  $Ca^{2+}$  koji dulje traje može rezultirati dugoročnom depresijom (*engl. long – term depression, LTD*) (114,115). Dakle, frekvencija i trajanje sinaptičke aktivacije NMDA

receptora mogu rezultirati potencijalnim pojačanjem ili inhibicijom sinaptičke učinkovitosti, što se smatra celularnim korelatom memorije i učenja (116).

Glutamat je dovoljan za aktivaciju AMPA i kainatnih receptora, dok su NMDA receptori jedinstveni po tome što za aktivaciju zahtijevaju simultano vezanje dvaju različitih agonista, glutamata i glicina/D-serina (117). U središnjem se živčanom sustavu NMDA receptori uglavnom oslanjaju na sinaptičko otpuštanje glutamata za aktivaciju, budući da se izvanstanični glicin ili D-serin smatra kontinuirano prisutnim. Ovisi o regiji mozga hoće li glicin ili D-serin služiti kao endogeni koagonist (118,119). Na primjer, nedavno je predloženo da je D-serin dominantni koagonist u sinapsama, dok je glicin češći na ekstrasinaptičkim mjestima (120).

U nekim regijama mozga glicin i D-serin nisu prisutni u koncentracijama koje zasićuju mjesta vezanja za koagoniste NMDA receptora (121,122). Stoga, potreba za koagonistima omogućuje dodatni mehanizam regulacije NMDA receptora. S obzirom na središnju ulogu NMDA receptora u normalnoj funkciji mozga njihova je poremetnja povezana s nizom patoloških stanja (123). U akutnim stanjima, kao što su ishemija, epilepsija i traumatska ozljeda mozga, povećanje izvanstaničnoga glutamata koji slijedi nakon pojačanog otpuštanja i oštećenog preuzimanja može uzrokovati snažan utok  $Ca^{2+}$  posredovan NMDA receptorom u neuron, što može promovirati odumiranje neurona (124,125). Pojava kojom se neuroni oštete zbog prijenosa signala glutamatom zove se ekscitotoksičnost (126).

Pretpostavlja se da će NMDAR antagonisti biti korisni u stanjima koja uključuju ekscitotoksičnost (127), ali jaka i neselektivna blokada NMDA receptora ima nuspojave, kao što su psihoza, oštećenje memorije, anestezija i odumiranje neuronalnih stanica čime se ograničava klinička uporabljivost takvih lijekova za kronična stanja (128).

Zanimljivo je da nuspojave blokatora kanala s visokim afinitetom za NMDA receptore nalikuju simptomima kod pacijenata s shizofrenijom. Opažanja o ovim "psihotomimetičkim" svojstvima blokatora kanala fenciklidina i ketamina dovela su do "modela hipofunkcije NMDA receptora za psihozu", koji predlaže da više simptoma povezanih sa shizofrenijom mogu biti uzrokovani nižom od normalne glutamatergičke aktivnosti posredovane NMDA receptorom u ključnim moždanim krugovima (128,129,130).

Što se tiče fiziološki relevantnih iona, ionski kanal NMDA receptora propustljiv je za  $Ca^{2+}$ , natrijeve ( $Na^{+}$ ) i kalijeve ( $K^{+}$ ) ione (131). Ionski kanali NMDA receptora blokirani su dvovalentnim kationima  $Zn^{2+}$  i  $Mg^{2+}$  ovisno o membranskom potencijalu (tj. naponski ovisno) (132,133).



### 1.3.2. NMDAR i bolesti

NMDA receptori razmatraju se u kontekstu brojnih neuroloških stanja, bilo kao uzrok, egzacerbirajući čimbenik ili terapijska meta (100).

Upotreba panantagonista NMDA receptora ketamina u depresiji prikaz je upotrebe NMDA receptora kao terapijske mete (134,135). Ketamin počne djelovati za nekoliko sati, učinak može trajati nekoliko dana do tjedana te je učinkovit u 70% bolesnika s depresijom. Smanjila se stopa suicidalne ideacije (136), ima određenoga benefita u bipolarnoj depresiji (137), opsesivno – kompulzivnom poremećaju (138) i posttraumatskom stresnom poremećaju (139). Nadalje, još jedan blokator NMDAR lanicemin pokazuje antidepresivni učinak. (140)

U razvoju središnjega živčanoga značajnu ulogu igra singaliziranje preko NMDA receptora. Kako je napomenuto gore, tijekom razvoja, visoka ekspresija podjedinica NMDA receptora GluN2B i GluN2D zamjenjuje se ekspresijom GluN2A (141,142). Ovim se posreduje prijelaz s visokih razina sinaptičke plastičnosti dok se krugovi formiraju i usavršavaju na stabilnost krugova odraslog mozga. Varijacije u genskim lokusama koje obuhvaćaju GRIN2A i GRIN2B (tj. gene koje kodiraju GluN2A i GluN2B) identificirane su u genomskim studijama (engl genome – wide association study, GWAS) kao doprinos riziku za razvoj autizma i shizofrenije (143,144).

Isprva je povezanost disfunkcije NMDA receptora sa shizofrenijom proizašla iz kliničkog zapažanja da inhibicija NMDA receptora u zdravih osoba izaziva spektar simptoma koji su slični onima koje pokazuju pacijenti koji boluju od shizofrenije (145,146). Ovi shizofrenomimetički simptomi usko se podudaraju sa zauzetošću NMDA receptora (147). To sugerira da bi ispoljavanje simptoma kod pacijenata sa shizofrenijom moglo biti posljedica hipofunkcije signalizacije NMDA receptora (148).

Geni GRIN1, GRIN2A i GRIN2B povezani su s epilepsijom (149). Nedavno se uspostavila deterministička veza između genske varijacije u GRIN2A i sindromu epilepsije/afazije u djetinjstvu. Spektar ovih sindroma uključuje relativno benigne Rolandovu epilepsiju, teži sindrom Landau-Kleffnerov sindrom (LKS), kao i vrlo teške epilepsije sa značajnim razvojnim zastojem, intelektualnim deficitom i dismorfim značajkama (150).

Još su Lucas i Newhouse 1957. (151) te Choi 1987. (152) utvrdili da trajno povišenje ekstracelularnog glutamata rezultira odumiranjem neurona, a ova ekscitotoksičnost doprinosi akutnoj smrti neurona u moždanog udara i traumatskoj ozljedi mozga (151,152). Ekscitotoksičnost posredovana NMDA receptorom može također doprinijeti odumiranju

neurona kod nekih kroničnih neurodegenerativnih bolesti, kao što je Huntingtonova bolest (153).

### **1.3.3. Antitijela na NMDAR i cervikalna distonija**

Poremećaji pokreta mogu nastati kao posljedica autoimune reakcije koja zahvaća središnji živčani sustav. Anti – NMDAR antitijela najbolje su poznata i vjerojatno najčešći uzrok autoimunoga encefalitisa koji zahvaća 1 na 1 i pol milijuna ljudi godišnje (98). Anti – NMDAR encefalitis je autoimuni encefalitis karakteriziran složenim neuropsihijatrijskim znacima i prisutnošću imunoglobulina G protiv NR1 podjedinice NMDAR u središnjem živčanom sustavu. Razvija se zbog stvaranja i vezanja IgG1 i IgG3 na podjedinicu NMDAR (NR1) s njegovom posljedičnom internalizacijom i smanjenjem utok kalcija te padom membranskoga potencijala. Prezentacija autoimunoga encefalitisa može varirati od izolirane hemidistonije preko oligosimptomatskoga encefalitisa do koreje i mioklonusa (99). Ipak, prikazi slučajeva Balinta govore u prilog o samostalnoj povezanosti anti - NMDAR protutijela s cervikalnom distonijom. Prijavljuje da ni u jednom slučaju uzrok antitijela nije bio tumorsko zbivanje te da nijedan prikaz nije fenotipski odgovorao klasičnom anti - NMDAR encefalitisu. U prilog tvrdnjama da postoji povezanost anti-NMDAR antitijela i cervikalne distonije jest i povlačenje simptoma bolesnika na liječenje steroidima i intravenskim imunoglobulinima (100). Anti – NMDAR protutijela inače se pronalaze i u ovarijskom teratomu gdje se u sklopu paraneoplastičnoga sindroma bolest manifestira s poremećajima pamćenja, psihijatrijskim simptomima, smanjenom sviješću i hipoventilacijom (101). Son i sur. (102) prikazali su zahvaćanje bazalnih ganglija u autoimunom encefalitisu koje je uzrokovalo konvulzivne napade (102). Nadalje, u prikazima slučajeva troje bolesnika pronađene su lezije u bazalnim ganglijama, a dvoje od njih su imali distoniju. Iako se distonija s lezijama u bazalnim ganglijama rijetko opisuje kod encefalitisa s anti-NMDAR protutijelima, treba je uočiti kao značajan simptom koji ozbiljno utječe na svakodnevne aktivnosti (103). Encefalitis herpes simplex virusom tipa 1 (HSV1), destruktivni je i vrlo inflamatorni encefalitis koji primarno zahvaća temporalne režnjeve i okolne strukture.

Nakon oporavka, kod otprilike petine djece s HSV1 encefalitisom dolazi do pogoršanja s "drugom fazom" encefalitisa, ovaj put s kliničkim karakteristikama tipičnim za anti - NMDAR encefalitis, uključujući izražene poremećaje pokreta i encefalopatiju, povezane s pojavom anti - NMDAR antitijela. Ovaj jasan primjer HSV1 encefalitisa koji inducira

sekundarni anti - NMDAR encefalitis doveo je do hipoteze da inflamatorno uništavanje neuralnog tkiva s otpuštanjem neuralnih antigena u okolno moždano tkivo, cirkulaciju i zatim limfni sustav, rezultira reaktivacijom autoreaktivnih limfocita protiv NMDAR antigena i produkcijom patogenih anti-NMDAR antitijela (104,105).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

### **Ciljevi istraživanja:**

1. Utvrditi razliku u koncentraciji NMDAR antitijela u ispitanika s cervikalnom distonijom prije i 2 mjeseca nakon injekcije botoksa.
2. Utvrditi razliku u koncentraciji NMDAR antitijela s obzirom na spol ispitanika s cervikalnom distonijom.
3. Utvrditi povezanost između promjene koncentracije antitijela na NMDAR i subjektivnoga dojma ispitanika s cervikalnom distonijom dva mjeseca nakon injekcije.
4. Utvrditi povezanost duljine bolesti i koncentracije NMDAR antitijela ispitanika s cervikalnom distonijom.

### **Hipoteze:**

1. Ne očekuju se promjene u koncentraciji antitijela na NMDAR prije te dva mjeseca nakon injekcije botulinum toksina u ispitanika s cervikalnom distonijom.
2. Očekuje se veća koncentracija antitijela na NMDAR u žena nego u muškaraca oboljelih od cervikalne distonije.
3. Očekuje se pozitivna povezanost između smanjenja koncentracije antitijela na NMDAR i subjektivnoga poboljšanja simptoma oboljelih s cervikalnom distonijom.
4. Očekuje se veća koncentracija anti – NMDAR antitijela u bolesnika koji imaju dulje trajanje bolesti (cervikalne distonije).

### **3. ISPITANICI I POSTUPCI**

Prava su i osobni podatci zaštićeni u sklad sa Zakonom o zaštiti prava bolesnika (NN 169/04, 37/08) te Zakonom o zaštiti osobnih podataka (NN 103/03-106/12), a studija je usuglašena s pravilnikom Kodeksa liječničke etike i deontologije (NN 55/08, 139/15) te Helsinškom deklaracijom. Istraživanje se odvijalo nakon odobrenja Etičkoga povjerenstva Klasa: 003-08 / 23-03 / 0015, Broj: 2181-198-03-04-23-0064-travanj 2023. Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

### **3.1. Ispitanici**

Uključeno je 11 bolesnika s cervikalnom distonijom. Uzorke se uzimalo prije ili neposredno nakon injekcije botulinum toksina te dva mjeseca poslije. Jedan ispitanik izbiva izvan države zbog čega se uzorak seruma dva mjeseca poslije injekcije botoksa nije mogao prikupiti, dodatno dvama ispitanicima nije prošlo vrijeme od dvaju mjeseci za ponovno dobivanje uzorka seruma. Prosječna dob ispitanika jest  $67,36 \pm 11,41$  godina. Sedam od jedanaest ispitanika bili su žene. Prosječno trajanje bolesti jest  $16,44 \pm 14,35$  godina. Sedam je ispitanika kontinuirano uzimalo botulinum toksin, dok je 2 prvi put uzelo botoks za liječenje cervikalne distonije, 1 osoba je primila dvije injekcije botoksa. Ispitaniku AM ustanovilo se da prima botoks tri godine, ali se nije moglo doći do podatka kada je prvi put osjetio simptome cervikalne distonije. Anamnestičkim skupljanjem podataka o subjektivnom dojmu ispitanika s cervikalnom distonijom nakon injekcije botoksa kategorijski se odredio odgovor na pogoršanje, stagniranje, slabo poboljšanje, umjereno poboljšanje te jako poboljšanje.

### 3.2. Postupci i metode

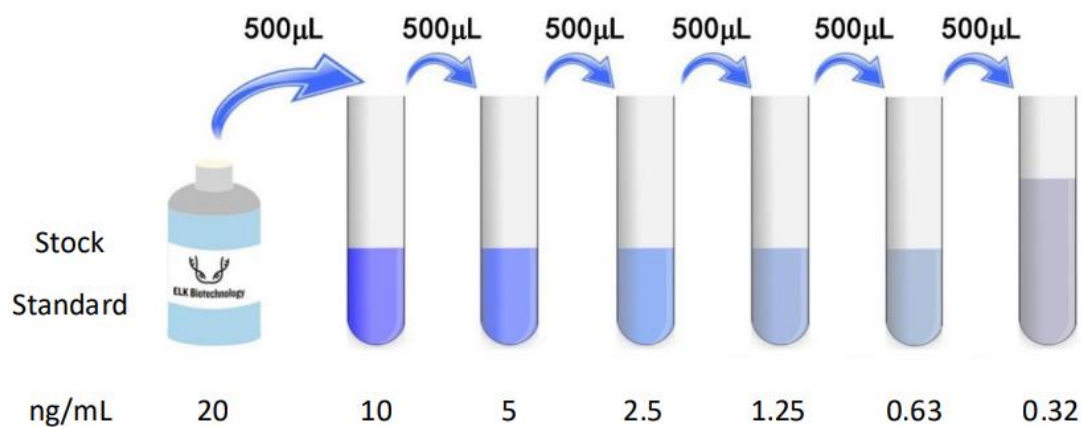
Na Klinici za neurologiju KBC-a Split obavio se neurološki pregled, injiciranje botulinum toksina te prikupljanje seruma isti dan. Dva mjeseca poslije obavilo se uzimanje seruma. Serum se analizirao na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu na Katedri za medicinsku kemiju i biokemiju.

Uzorke seruma trebalo je sakupiti u epruvetu za odvajanje seruma. Zgrušavanje je trajalo 2 sata na sobnoj temperaturi, zatim se centrifugiralo na 1000 okretaja 20 minuta.

Nisu se koristili hemolizirani uzorci jer hemoliza utječe na rezultate. Prilikom izvođenja testa uzorci su bili na sobnoj temperaturi. Obavljen je preliminarni pokus kojim smo utvrdili da uzorke nije potrebno razrjeđivati.

Reagensi se pripremaju na način da se sve komponente kompleta i uzorci trebaju prije upotrebe zagrijati na sobnu temperaturu (18-25°C). Prije upotrebe kompleta osigurano je da su sve komponente otopljene i dobro promiješane. 25x pufer za ispiranje razrijedio se u 1x pufer za ispiranje uz pomoć dvostruko destilirane vode. Standardna radna otopina centrifugirana je na 1000 okretaja 1 minutu. Rekonstituiran je standard s 1,0 mL standardnoga pufera za razrjeđivanje, držalo se 10 minuta na sobnoj temperaturi, lagano protreslo (da se ne napravi pjena). Koncentracija otopine standarda je 20 ng/mL. Pripremljeno je 7 epruveta koje sadrže 0,5 mL standardnoga pufera za razrjeđivanje i koristili razrijeđeni standard za izradu serije dvostrukih razrjeđivanja prema priloženoj slici. Svaka se epruveta promiješala prije sljedećeg prijenosa tako što se nekoliko puta pipetom usisalo i ispustilo otopinu. Slika 5. prikazuje postavljenih 7 točaka razrijeđenog standarda 20 ng/mL, 10 ng/mL, 5 ng/mL, 2,5 ng/mL, 1,25 ng/mL, 0,63 ng/mL, 0,32 ng/mL, a u posljednjoj epruveti nalazi se standardni pufer za razrjeđivanje 0 ng/ml. Posljednja se epruveta promatrala kao prazna i nije trebalo u nju pipetirati otopinu iz prethodne epruvete.





**Slika 5.** Preuzeto i prilagođeno iz: ELK Biotechnology CO., Ltd. Human GRIN1(Glutamate Receptor, Iontropic,N-Methyl-D-Aspartate 1) ELISA Kit [Internet]. Wuhan. ELK Biotechnology; 2024. [citirano 4.srpnja 2024.]. Dostupno na: <https://www.elkbiotech.com/pro/ELK5387>

1x Biotinilirano antitijelo i 1x Streptavidin-HRP kratko se centrifugiraju prije upotrebe. Razrijede se 100 puta na radnu koncentraciju biotiniliranim puferom za razrjeđivanje antitijela i HRP puferom za razrjeđivanje. Aspirira se potreban volumen TMB supstratne otopine sterilnim vrhom i ne vraća se preostala otopina nazad u bocu.

Prije upotrebe svi su se reagensi zagrijali na sobnu temperaturu (18-25°C). Normalna je pojava da se u koncentratu (25x) stvore kristali. Zagrijalo se na sobnu temperaturu (temperatura zagrijavanja ne smije prelaziti 40°C), nježno promiješalo dok se kristali nisu potpuno otopili.

Otapanje standarda vršilo se 15 minuta prije testa. Da bi se osigurala preciznost pokusa testirao se duplikat jamica, a prilikom pipetiranja reagensa, držali smo se konzistentnog redoslijeda dodavanja od jedne jamice do druge, čime je osigurano isto vrijeme inkubacije za sve jamice.

Tijekom procesa pranja mikrotitarske pločice, ostatci tekućine za pranje u reakcijskoj jamici osušili su se apsorbirajućim papirom. Papir se ne stavlja direktno u reakcijsku jamicu. TMB supstratna otopina je osjetljiva na svjetlost zbog čega smo izbjegavali izlaganje svjetlosti.

Dodijelilo se TMB supstratnu otopinu unutar 15 minuta nakon pranja mikrotitarske pločice. Osim toga, izbjegavao se dodir TMB supstratne otopine s metalom kako bi se spriječilo razvijanje boje. TMB je toksičan zbog čega smo izbjegavali direktni kontakt s rukama.

Princip testa primijenjen u istraživanju je sendvič imunoenzimski test. Mikrotitarska pločica priložena ovom kompletu prethodno je prekrivena antitijelom specifičnim za humani N-metil-D-aspartat ionotropni glutamatni receptor (*engl. Glutamate Receptor, Iontropic, N-metil-D-aspartat 1, GRIN1*). Dodani su standardi ili uzorci u odgovarajuće jamice mikrotitarske

pločice s biotiniliranim antitijelom specifičnim za humani GRIN1. Zatim se u svaku jamicu mikrotitarske pločice dodao avidin konjugiran s peroksidazom hrena (*engl. Horseradish Peroxidase, HRP*) te inkubirao. Nakon dodavanja otopine supstrata tetrametilbenzidina (*engl. tetramethylbenzidine, TMB*), samo one jamice koje sadrže humani GRIN1, biotinilirano antitijelo i enzimom konjugirani avidin mijenjaju boju. Reakcija enzima i supstrata zaustavlja se dodavanjem otopine sumporne kiseline, a promjena boje mjeri se spektrofotometrijskim putem na valnoj duljini od  $450 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ . Koncentracija humanog GRIN1 u uzorcima se tada određuje uspoređivanjem optičke gustoće (*engl. optical density, OD*) vrijednosti uzoraka sa standardnom krivuljom. Detaljni opis sendvič imunoenzimskog testa jest:

- U odgovarajuće jamice dodano je po 100  $\mu\text{L}$  standardne radne otopine ili 100  $\mu\text{L}$  uzoraka. Pokriveno je poklopcem ploče. Inkubirano je 80 minuta na  $37^\circ\text{C}$ .
- Ispuštena je tekućina iz svake jamice. Usisana je otopina i oprano je s 200  $\mu\text{L}$  1x pufera za ispiranje u svakoj jamici i ostavljeno je da stoji 1 - 2 minute. Potpuno je uklonjena preostala tekućina iz svih jamica lupkanjem pločice o apsorbirajući papir. Ispere se ukupno 3 puta. Nakon posljednjeg pranja, uklonjen je preostali pufer za ispiranje usisavanjem ili prelijevanjem. Pločica je okrenuta naopako i osušena je apsorbirajućim papirom.
- U svaku jamicu doda se 100  $\mu\text{L}$  radne otopine biotiniliranih antitijela, pokrije se jamica poklopcem ploče i inkubira se 50 minuta na  $37^\circ\text{C}$ .
- Ponovi se proces usisavanja i ispiranja ukupno 3 puta kao što je prethodno provedeno.
- U svaku jamicu dodaje se 100  $\mu\text{L}$  radnog otopine Streptavidin-HRP, pokriju se jamice poklopcem ploče i inkubiraju 50 minuta na  $37^\circ\text{C}$ .
- Ponovi se proces usisavanja i ispiranja ukupno 5 puta kao što je prethodno provedeno.
- U svaku jamicu dodaje se 90  $\mu\text{L}$  TMB supstrata. Pokrije se novim poklopcem ploče. Inkubira se 20 minuta na  $37^\circ\text{C}$  (ne prelazite 30 minuta) u tami. TMB supstratna otopina oboji tekućinu u plavo. Zagrije se čitač mikrotitarskih pločica oko 15 minuta prije mjerenja OD vrijednosti.
- U svaku jamicu dodaje se 50  $\mu\text{L}$  stopnog reagensa. Otopina porumeni nakon dodavanja stopnog reagensa. Promiješana je otopina iganim lupkanjem po strani ploče.
- Obrišu se sve kapljice vode i otisci prstiju s dna pločice i provjeri se da nema mjehurića na površini. Zatim je pokrenut čitač mikrotitarskih pločica i proveli mjerenje na valnoj duljini od 450nm.
- Izračunat je prosjek vrijednosti duplikata za svaki standard, kontrolu i uzorak. Od prosjeka je oduzeta optička gustoća standarda nule.

- Konstruirana je standardna krivulja s koncentracijom humanog GRIN1 proteina na y-osi i apsorbancijom na x-osi. Nacrtana je najbolja prikladnu krivulja kroz točke na grafikonu.

Sažeti pregled postupka sendvič imunoenzimske analize je da nakon što se komplet ekvilibrira na sobnu temperaturu, da se dodaje 100  $\mu$ L standardnoga radnog pufera (postupno razrijeđenog) ili 100  $\mu$ L uzorka u svaku jamicu mikrotitarske pločice i inkubira se na 37°C 80 minuta. Uklanja se tekućina iz mikrotitarske pločice, dodaje se 200  $\mu$ L pufera za ispiranje jedanput u svaku jamicu i opere se pločica 3 puta. Nakon što se osuši na čistom apsorbirajućem papiru, dodaje se 100  $\mu$ L otopine biotiniziranih antitijela jedanput u svaku jamicu te se inkubira na 37°C 50 minuta. Uklanja se tekućina iz mikrotitarske pločice, dodaje se 200  $\mu$ L pufera za ispiranje jedanput u svaku jamicu i opere se pločica 3 puta. Nakon što se osuši na apsorbirajućem papiru, dodaje se 100  $\mu$ L otopine Streptavidin-HRP jedanput u svaku jamicu te se inkubira na 37°C 50 minuta. Uklanja se tekućina iz mikrotitarske pločice, dodaje se 200  $\mu$ L pufera za ispiranje jedanput u svaku jamicu i opere se pločica 5 puta. Nakon što se osuši na čistom apsorbirajućem papiru, dodaje se 90  $\mu$ L otopine supstrata TMB u svaku jamicu i inkubira na 37°C 20 minuta u tamu. Naposljetku, dodaje se 50  $\mu$ L stopne otopine u svaku jamicu, protrese se mikrotitarska pločica na vibracijskom uređaju za pločice 1 minutu kako bi se promiješala. Zapisane su OD vrijednosti na 450 nm, a zatim smo izračunali rezultate. (161)

### 3.3. Statistička obrada podataka

Srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija, medijan zajedno s interkvartilnim rasponom te minimalna i maksimalna vrijednost poslužila je za prikaz kvantitavnih varijabli. Cijelim brojevima i postocima prikazalo se kategorijske varijable. Podatke se analiziralo s alatom Jamovi 2.3.

Da se testira razlika koristila se jednosmjerna analiza varijance i t – test za nezavisne uzorke. Povezanost se računala preko Pearsonova koeficijenta korelacije.  $P < 0,05$  postavljena je kao značajna vrijednost. Pearsonov se koeficijent korelacije rabio za provjeru

povezanosti promjene koncentracije anti – NMDAR antitijela prije i poslije botoksa te subjektivnoga dojma bolesnika o simptomima.

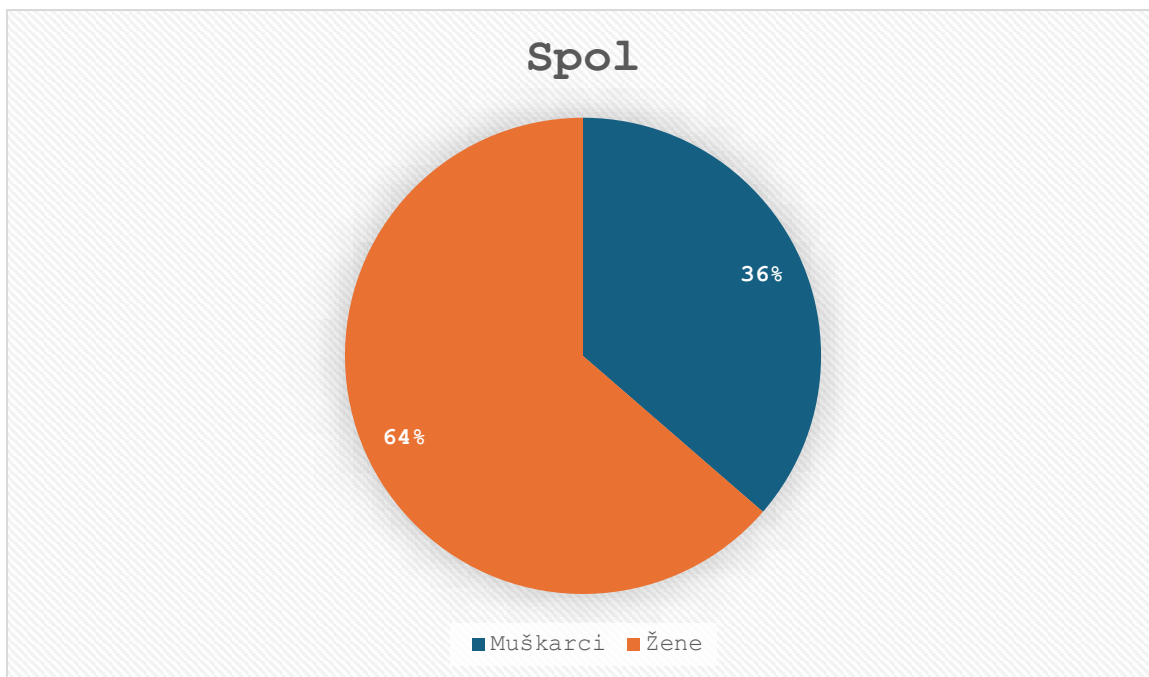
## **4. REZULTATI**

**Tablica 2.** Osnovne demografske karakteristike ispitanika s cervikalnom distonijom

Mjera	Bolesnici s	Žene s	Muškarci s
Srednja vrijednost ± SD	cervikalnom distonijom (N=10)*	cervikalnom distonijom (N=7)	cervikalnom distonijom (N=3)*
Dob	67,36 ± 11,41	67,86 ± 11,32	70 ± 9,2
Visina (cm)	170,9 ± 8,89*	167 ± 7,05	180 ± 1,63
Tjelesna masa (kg)	77,3 ± 15,41 *	71,43 ± 13,16	91 ± 6,38
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	26,39 ± 4,32*	25,64 ± 4,44	28,12 ± 2,38
Žene/Muškarci (n)	1,75	-	-

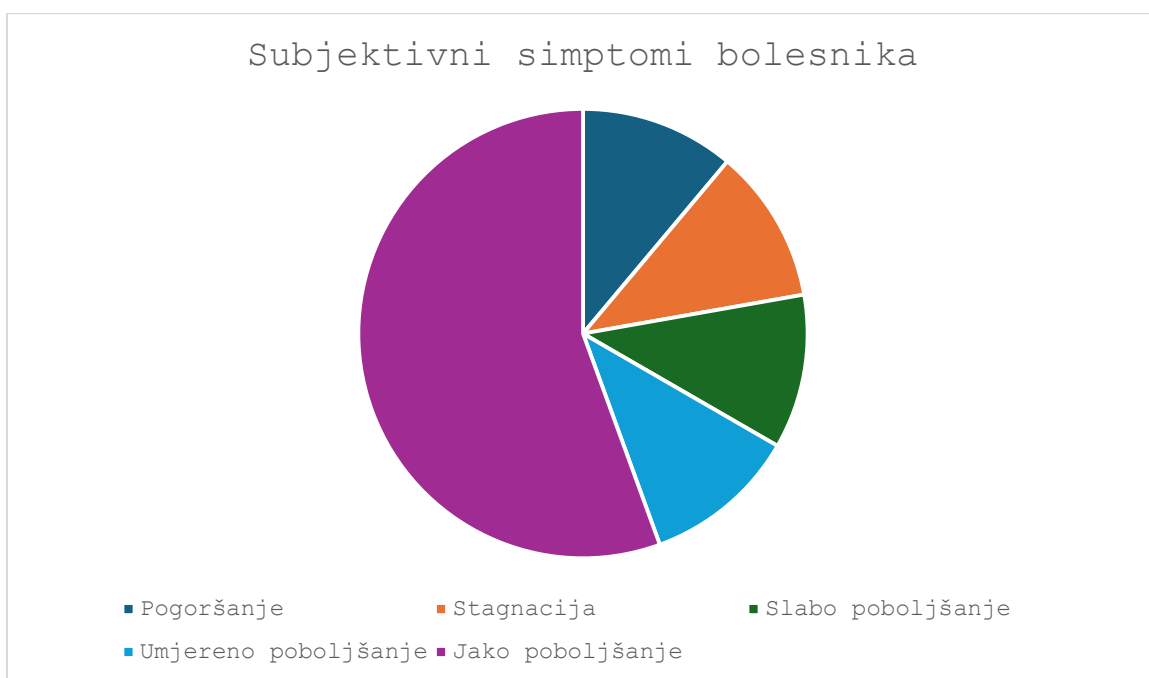
Osnovne mjere prikazane su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. ITM – indeks tjelesne mase; n – broj ispitanika; \*nije prikupljen podatak za AM

Među bolesnicima kojima je dijagnosticirana cervikalna distonija te koji su pristali sudjelovati bilo je 7 žena (63,64%) te 4 muškarca (36,36%), omjer žena naspram muškaraca jest 1,75/1. Na Slici 6 prikazana je raspodjela po spolu oboljelih od cervikalne distonije.



**Slika 6.** Grafički prikaz raspodjele osoba koje boluju od cervikalne distonije

Osam ispitanika iskazalo je subjektivni osjećaj poboljšanja simptoma dva mjeseca nakon injekcije botoksa, Jedna je ispitanica posvjedočila da ne postoji promjena u subjektivnom osjećaju simptoma cervikalne distonije dva mjeseca nakon injekcije, dok je jedna ispitanica imala subjektivni osjećaj pogoršanja simptoma dva mjeseca nakon injekcije botoksa. Pet je ispitanika prijavilo jako poboljšanje simptoma. Na Slici 7 prikazana je raspodjela ispitanika po subjektivnim simptomima oboljelih od cervikalne distonije.



**Slika 7.** Grafički prikaz usporedbe subjektivnih simptoma bolesnika 2 mjeseca nakon injekcije botoksa

**Tablica 3.** Kvantitativna varijabla markera bolesti (N = 11)

<b>Varijabla</b>	<i>M</i>	<i>SD</i>	Medija n	Min	Max	IQR	F	<i>Df</i>	<i>P</i>
NMDAR At prije(ng/ml)	5,65	0,97	5	1,9	11,6	3-7,6	1,089	1	0,3112
*NMDAR At poslije(ng/ml)	8,23	2,58	4,65	1	17,2	1,9-16,88			

*M* – aritmetička sredina ili srednja vrijednost, *SD* – standardna devijacija, *min* – minimalna vrijednost, *max* – maksimalna vrijednost, *IQR* - interkvartilna vrijednost, \* 8 ispitanika

Prema podacima iz Tablice 3. ne postoje statistički značajne razlike u koncentraciji antitijela na NMDAR među bolesnicima na početku terapije botulinum toksinom te dva mjeseca poslije ( $P > 0,05$ ).

Nije utvrđena statistički značajna razlika između promjene serumske koncentracije i subjektivnoga dojma oboljeloga ( $r = 0,13$ ,  $P = 0,89$ ). No, treba se naglasiti da je 5 bolesnika koji su usmeno iskazali jako poboljšanje simptoma nakon injekcije botoksa svi redom imali smanjenje koncentracije antitijela na NMDAR dva mjeseca poslije primanja injekcije.



**Tablica 4.** Prikaz koncentracije antitijela u žena prije i poslije injekcije botoksa (N=7)

Varijabla	M	SD	Medija n	Min	Max	IQR	t
NMDAR At prije (ng/ml)	5,9	2,64	5	3	11	4,4 - 7,6	0,5
*NMDAR At poslije (ng/ml)	7,9	7,06	4,65	1	17,2	12,8 - 16,88	

At – antitijelo, M – aritmetička sredina ili srednja vrijednost, SD – standardna devijacija, min – minimalna vrijednost, max – maksimalna vrijednost, IQR – interkvartilni raspon, \*N=6

**Tablica 5.** Prikaz koncentracije antitijela u muškaraca prije i poslije injekcije botoksa (N=4)

Varijabla	M	SD	Medija n	Min	Max	IQR	t
NMDAR At prije (ng/ml)	5,23	450,36	3,7	1,9	11,6	1,98 – 10	0,53
*NMDAR At poslije (ng/ml)	9,2	1103,0 9	9,2	1,4	17	1,05 – 14,05	

At – antitijelo, M – aritmetička sredina ili srednja vrijednost, SD – standardna devijacija, min – minimalna vrijednost, \*N=2

Prikazom ženskih uzoraka seruma u Tablici 4. nije se pronašla statistički značajna razlika u koncentraciji antitijela prije i poslije injekcije botoksa ( $P > 0,05$ ). Tablica 5. pokazuje da se statistički značajna razlika ne može utvrditi ni u muških uzoraka ( $P > 0,05$ ).

**Tablica 6.** t-test za određivanje razlike u koncentraciji anti – NMDAR antitijela s obzirom na spol ispitanika s cervikalnom distonijom (N=11).

Varijabla	$M_M$	$M_{\bar{z}}$	$SD_M$	$SD_{\bar{z}}$	t	df	P
NMDAR At (ng/ml)	6,55	6,82	6,38	5,04	0,10	17	0,92

At – antitijelo,  $M_M$  – srednja vrijednost muškaraca,  $M_{\bar{z}}$  – srednja vrijednost žena,  $SD_M$  – standardna devijacija muškaraca,  $SD_{\bar{z}}$  – standardna devijacija žena

Tablica 6. prikazuje da se t – testom za nezavisne uzorke nije pronašla statistički značajna razlika u koncentraciji NMDAR antitijela s obzirom na spol ( $P = 0,92$ ).

## **5. RASPRAVA**

Nakon Parkinsonove bolesti i esencijalnoga tremora distonija je treći najčešći poremećaj pokreta (162). Fokalna je distonija najčešća te zahvaća samo jedan dio tijela. Najčešći fokalni oblik jest upravo cervikalna distonija (163). Prevalencija cjelokupne distonije je 601,1/1000000 od čega je cervikalna distonija najčešća s prevalencijom od 251,1/1000000 (5). U cervikalnoj su distoniji žene pogođene gotovo tri i pol puta više od muškaraca prilikom čega je prosječna dob oboljelih 63,8 s prosječnom dobi početka bolesti od 45,5 te prosječnim trajanjem bolesti od 14,6 godina. (5,10) U našoj studiji sudjelovali su ispitanici koji su bili nešto stariji, s prosječnom dobi bolesnika od 68,5 godina.

Mehanizam je nastanka cervikalne distonija složen i ne sasvim poznat. Posljedica je više uzroka, genetski zajedno sa sekundarnim uzrocima. Ipak, najveći dio cervikalnih distonija klasificira se kao idiopatski oblik (11,15). Siriratmanova metaanaliza naglašava važnost imunoloških mehanizama u nastanku bolesti poremećaja pokreta, što uključuje koreju, mioklonus i distoniju. Anti – NMDAR antitijela imala su najveću prevalenciju među svim antitijelima te je u drugoj studiji ustanovljeno da encefalitis posredovan anti – NMDAR antitijelima kao glavnu kliničku sliku može imati cervikalnu distoniju (27,28). Dijagnoza bolesti postavlja se na temelju kliničkoga pregleda kojim se dobiva uvid u prisutnost suportivnih te izostanak isključujućih kriterija (40). Usprkos tomu, dijagnosticiranje cervikalne distonije i dalje je podložno pogreškama zbog široke lepeze simptoma i znakova kojima se može manifestirati te time navesti liječnike na krivi trag zbog čega je korisno imati visokoosjetljivi i visokospecifični marker za prepoznavanje te bolesti (25). Balint i sur. (156) prijavljuju prisutnost anti – NMDAR antitijela u izoliranoj kranio-cervikalnoj distoniji koja se pojavljuje i samostalno i u sklopu encefalopatskih sindroma. Korelacija i korisnost kao visokoosjetljivih i visokospecifičnih markera treba se dokazati (156,164).

Anti – NMDAR antitijela korisna su kao marker u autoimunom encefalitisu. Različiti podtipovi anti – NMDAR antitijela mogu poslužiti kao diferencirajući biomarker između akutno nastale shizofrenije i autoimunoga encefalitisa (165).

Većina se autoimunih bolesti češće se pojavljuje među ženama, cervikalna je distonija češća kod žena. U cervikalnoj distoniji žene su zahvaćene 3 do 3 i pol puta više od muškaraca. U našoj studiji pronašli smo da žene češće boluju od cervikalne distonije s omjerom žena 1,75:1 naspram muškaraca, što ne odgovara u potpunosti rezultatima Le Doux i sur. (9). Nizak omjer žena naspram muškaraca u našem istraživanju vjerojatno je

rezultat nedovoljno velike skupine bolesnika.

Nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji anti – NMDAR antitijela prije i dva mjeseca poslije davanja injekcije botoksa u serumu među bolesnicima koji su imali subjektivni osjećaj pogoršanja ili stagniranja simptoma. Nasuprot tomu, smanjila se koncentracija antitijela kada se gleda koncentracija netom prije davanja botoksa i dva mjeseca poslije u bolesnika koji su imali subjektivni osjećaj jakoga poboljšanja nakon injekcije botoksa.

U našem istraživanju nije se pronašlo razlike u koncentraciji anti – NMDAR antitijela između muškaraca i žena. Razlog ovomu može biti malen broj ispitanika sveukupno, a napose malen broj muških ispitanika.

Moguća uloga anti – NMDAR antitijela kao dijagnostičkoga biomarkera trenutno nije jasna te zahtijeva daljnji istraživački rad. Rezultati našega istraživanja pokazali su da 5 ispitanika sa subjektivnim osjećajem jakoga poboljšanja simptoma nakon botoksa imaju manju koncentraciju antitijela ( $r = 0,13$ ;  $P=0,89$ ). Daljnja istraživanja uz veći broj ispitanika pokazat će je li antitijelo na NMDA receptore marker moguće koristiti kao marker u praćenju tijeka bolesti.

Nadalje, utvrđena je statistički značajna pozitivna korelacija između duljine bolesti i prve koncentracije anti – NMDAR antitijela ( $r=0,653$ ,  $P=0,04$ ). Mogući razlog je da su bolesnici kojima je teža klinička slika više suradljivi te voljni ostati dulji vremenski interval pod pregledima specijalista neurologije od onih kojima je klinička slika blaža te da je sama težina kliničke slike povezana s sa serumskom koncentracijom anti – NMDAR antitijela. Pozitivna se korelacija nije utvrdila s drugom serumskom koncentracijom anti – NMDAR antitijela. Potencijalno je objašnjenje da je anti – NMDAR antitijelo monitorirajući marker te da se terapijom cervikalne distonije njegova koncentracija snizi. Naravno, potrebna su daljnja istraživanja kojima bi se potvrdila ovakva uloga antitijela na NMDAR.

Istraživanje ima svoja ograničenja, a to su: a) regrutacija bolesnika u samo jednom kliničkom bolničkom centru u kratkom vremenskom periodu, b) nismo imali mogućnost primjene ocjenskih ljestvica za cervikalnu distoniju kojima bi se dalje mogla ispitati upotreba anti – NMDAR antitijela za ocjenu stanja poslije botoksa, c) nije uključena kontrolna skupina ispitanika.

Naše je istraživanje na malom uzorku od 11 ispitanika pokazalo povezanost između anamnestičkih podataka o težini cervikalne distonije te prve serumске koncentracije anti – NMDAR antitijela. Uočen je pozitivan trend smanjenja koncentracije anti – NMDAR

antitijela nakon botoksa i jakoga poboljšanja simptoma cervikalne distonije. Ovi podatci navode na nužnost provođenja daljnjih istraživanja NMDAR i njegove uloge u cervikalnoj distoniji.

## **6. ZAKLJUČCI**

Rezultati naše studije upućuju na sljedeće zaključke:

1. Ne očekuju se promjene u koncentraciji antitijela na NMDAR prije te dva mjeseca nakon injekcije botulinum toksina u ispitanika s cervikalnom distonijom. Hipoteza 1 je potvrđena.
2. Ne očekuje se veća koncentracija antitijela na NMDAR u žena nego u muškaraca oboljelih od cervikalne distonije. Hipoteza 2 nije potvrđena.
3. Očekuje se pozitivna povezanost između smanjenja koncentracije antitijela na NMDAR i subjektivnoga poboljšanja simptoma oboljelih s cervikalnom distonijom. Hipoteza 3 djelomično je potvrđena.
4. Očekuje se veća koncentracija anti – NMDAR antitijela u bolesnika koji imaju dulje trajanje bolesti (cervikalne distonije). Hipoteza 4 djelomično je potvrđena.

## **7. LITERATURA**



1. Klein C, Fahn S. Translation of Oppenheim's 1911 paper on dystonia. *Movement Disorders*. 2013;28:851–62.
2. Albanese A, Bhatia K, Bressman SB, DeLong MR, Fahn S, Fung VSC i sur. Phenomenology and classification of dystonia: A consensus update. *Movement Disorders*. 2013;28:863–73.
3. LeDoux MS. Dystonia: phenomenology. *Parkinsonism & Related Disorders*. 2012;18:S162–4.
4. Camfield L, Ben-Shlomo Y, Warner TT. Impact of cervical dystonia on quality of life. *Movement Disorders*. 2002;17:838–41.
5. Dressler D, Altenmüller E, Giess R, Krauss JK, Adib Saberi F. The epidemiology of dystonia: the Hannover epidemiology study. *Journal of Neurology*. 2022;269:6483–93.
6. Nutt JG, Muenter MD, Aronson A, Kurland LT, Melton LJ. Epidemiology of focal and generalized dystonia in Rochester, Minnesota. *Movement Disorders*. 1988;3:188–94.
7. Claypool DW, Duane DD, Ilstrup DM, Melton LJ. Epidemiology and outcome of cervical dystonia (spasmodic torticollis) in Rochester, Minnesota. *Movement Disorders*. 1995;10:608–14.
8. Marras C, Van den Eeden SK, Fross RD, Benedict-Albers KS, Klingman J, Leimpeter AD, et al. Minimum incidence of primary cervical dystonia in a multiethnic health care population. *Neurology*. 2007;69:676–80.
9. LeDoux MS, Vemula SR, Xiao J, Thompson MM, Perlmutter JS, Wright LJ i sur. Clinical and genetic features of cervical dystonia in a large multicenter cohort. *Neurology Genetics*. 2016;2:e69.
10. Chan J, Brin MF, Fahn S. Idiopathic cervical dystonia: Clinical characteristics. *Movement Disorders*. 1991;6:119–26.
11. LaHue SC, Albers K, Goldman S, Lo RY, Gu Z, Leimpeter A i sur. Cervical Dystonia Incidence and Diagnostic Delay in a Multiethnic Population. *Movement Disorders*. 2019;35:450–6.
12. Brinar V i sur. *Neurologija za medicinare*. 2. izdanje. Zagreb: Medicinska Naklada; 2009. 311-13 str.
13. Marsden CD. Investigation of dystonia. *Adv Neurol* 1988; 50: 35-44
14. Jinnah HA, Berardelli A, Comella C, DeFazio G, DeLong MR, Factor S i sur. The focal dystonias: Current views and challenges for future research. *Movement Disorders*. 2013;28(7):926–43.

15. National Library of Medicine. Hereditary dystonia overview [Internet]. Seattle: National Library of Medicine; 2003 [citirano 4.srpnja 2024.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1155/>
16. Galardi G, Perani D, Grassi F, Bressi S, Amadio S, Antoni MH i sur. Basal ganglia and thalamo-cortical hypermetabolism in patients with spasmodic torticollis. *Acta Neurologica Scandinavica*. 1996;94:172–6.
17. Batla A, Sánchez MC, Erro R, Ganos C, Stamelou M, Balint B i sur. The role of cerebellum in patients with late onset cervical/segmental dystonia?—Evidence from the clinic. *Parkinsonism & Related Disorders*. 2015;21:1317–22.
18. Li Z, Prudente CN, Stilla R, Sathian K, Jinnah HA, Hu X. Alterations of resting-state fMRI measurements in individuals with cervical dystonia. *Human Brain Mapping*. 2017;38:4098–108.
19. Holmes AL, Forcelli PA, DesJardin JT, Decker AL, Teferra M, West EA i sur. Superior Colliculus Mediates Cervical Dystonia Evoked by Inhibition of the Substantia Nigra Pars Reticulata. *The Journal of Neuroscience*. 2012;32:13326–32.
20. Pirio Richardson S. Enhanced dorsal premotor–motor inhibition in cervical dystonia. *Clinical Neurophysiology*. 2015;126:1387–91.
21. Prudente CN, Stilla R, Singh S, Buetefisch C, Evatt M, Factor SA i sur. A Functional Magnetic Resonance Imaging Study of Head Movements in Cervical Dystonia. *Frontiers in Neurology*. 2016;7:201.
22. Corp DT, Juho Joutsa, R Ryan Darby, Cathérine C.S. Delnooz, van, Cooke D i sur. Network localization of cervical dystonia based on causal brain lesions. 2019;142:1660–74.
23. Karimi M, Perlmutter JS. The role of dopamine and dopaminergic pathways in dystonia: insights from neuroimaging. *PubMed*. 2015;5:280–0.
24. Food and Drug Administration, HHS. International Conference on Harmonisation; guidance on E14 Clinical Evaluation of QT/QTc Interval Prolongation and Proarrhythmic Potential for Non-Antiarrhythmic Drugs; availability. *Notice. Fed Regist.* 2005;70:61134-5.
25. Jinnah HA. The Dystonias. *Continuum: Lifelong Learning in Neurology*. 2019;25:976–1000.
26. Baizabal-Carvallo JF, Jankovic J. Autoimmune and paraneoplastic movement disorders: An update. *Journal of the Neurological Sciences*. 2018;385:175–84.

27. Pakeeran Siriratnam, Laura McArthur, Zhibin Chuen, Peter Kempster, Mastura Monif. Movement disorders in cell surface antibody mediated autoimmune encephalitis; a meta-analysis. *Frontiers in Neurology*. 2023;14:1225523.
28. Waller SE, Williams L, Lee AYS, Lin MW, McCusker E, Morales-Briceño H, Fung VSC. Isolated Craniocervical Dystonia Without Initial Neuropsychiatric Manifestations Associated with NMDA-Receptor Antibodies. *Mov Disord Clin Pract*. 2022;10:680-2.
29. Gaig C, Compta Y, Heidebreder A, Marti MJ, Titulaer MJ, Crijnen Y i sur. Frequency and Characterization of Movement Disorders in Anti-IgLON5 Disease. *Neurology*. 2021;97:e1367–81.
30. Miranda M, Bustamante ML, Campero M, Wainstein E, Toche P, Espay AJ i sur. Movement disorders in non-encephalopathic Hashimoto’s thyroiditis. *Parkinsonism & Related Disorders*. 2018;55:141–2.
31. National Library of Medicine. Network localization of pediatric lesion-induced dystonia [Internet]. National Library of Medicine; 2024 [citirano 4.srpnja 2024.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11030491/>
32. Yadav R, Shankar V, Desai S. Infection-associated dystonia: A narrative review. *Annals of Movement Disorders*. 2021;4:111.
33. Nakawah MO, Lai EC. Post-stroke dyskinesias. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 2016;12:2885–93.
34. Dinkelbach L, Hartmann CJ, Mathys C, Wojtecki L, Hänggi D, Südmeyer M. Cervical dystonia caused by focal putaminal ischemia. *Annals of Clinical and Translational Neurology*. 2015;2:1029–31.
35. Liu C, Scorr L, Kilic-Berkmen G, Cotton A, Factor SA, Freeman A i sur. A metabolomic study of cervical dystonia. *Parkinsonism & Related Disorders*. 2021;82:98–103.
36. Patel N, Hanfelt J, Marsh L, Jankovic J. Alleviating manoeuvres (sensory tricks) in cervical dystonia. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2014;85:882–4.
37. Schramm A, Reiners K, Naumann M. Complex mechanisms of sensory tricks in cervical dystonia. *Movement Disorders*. 2004;19:452–8.
38. Rosales RL, Cuffe L, Regnault B, Trosch RM. Pain in cervical dystonia: mechanisms, assessment and treatment. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2021;21:1125–34.
39. Chan J, Brin MF, Fahn S. Idiopathic cervical dystonia: Clinical characteristics. *Movement Disorders*. 1991;6:119–26.

40. Albanese A, Bhatia KP, Cardoso F, Comella CL, Defazio G, Fung VSC, et al. Isolated Cervical Dystonia: Diagnosis and Classification. 2023;38:1367-1378
41. Spiegel LL, Ostrem JL, Bledsoe IO. FDA Approvals and Consensus Guidelines for Botulinum Toxins in the Treatment of Dystonia. *Toxins*. 2020;12:332.
42. Dong M, Masuyer G, Stenmark P. Botulinum and Tetanus Neurotoxins. *Annual Review of Biochemistry*. 2019;88:811–37.
43. Hallett M. Explanation of timing of botulinum neurotoxin effects, onset and duration, and clinical ways of influencing them. *Toxicon*. 2015;107:64–7.
44. Simpson DM, Hallett M, Ashman EJ, Comella CL, Green MW, Gronseth GS, et al. Practice guideline update summary: Botulinum neurotoxin for the treatment of blepharospasm, cervical dystonia, adult spasticity, and headache. *Neurology*. 2016;86:1818–26.
45. Tsui JK, Eisen A, Mak E, Carruthers J, Scott A, Calne DB. A Pilot Study on the Use of Botulinum Toxin in Spasmodic Torticollis. *Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien des Sciences Neurologiques*. 1985;12:314–6.
46. Truong D, Duane DD, Jankovic J, Singer C, Seeberger LC, Comella CL i sur. Efficacy and safety of botulinum type A toxin (Dysport) in cervical dystonia: Results of the first US randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Movement Disorders*. 2005;20:783–91.
47. Brans M, Majid Aramideh, Johannes, Lindeboom R, Speelman JD, de O. Electromyography in cervical dystonia. 1998;51:815–9.
48. Finsterer J, Maeztu C, Revuelta GJ, Reichel G, Truong DD. Collum-caput (COL-CAP) concept for conceptual anterocollis, anterocaput, and forward sagittal shift. *Journal of the Neurological Sciences*. 2015;355:37–43.
49. Sonography-guided injection of botulinum toxin in children with cerebral palsy. *The Lancet*. 2004;363: 249–50.
50. Kirchmair L, Entner T, Wissel J, Moriggl B, Kapral S, Mitterschiffthaler G. A Study of the Paravertebral Anatomy for Ultrasound-Guided Posterior Lumbar Plexus Block. *Anesthesia & Analgesia*. 2001;93:477–81.
51. Heinen F, Desloovere K, Schroeder AS, Berweck S, Borggraefe I, van Campenhout A i sur. The updated European Consensus 2009 on the use of Botulinum toxin for children with cerebral palsy. *European Journal of Paediatric Neurology*. 2010;14:45–66.
52. Gray AT. Ultrasound-guided Regional Anesthesia. *Anesthesiology*. 2006;104:368–73.

53. Schramm A, Bäumer T, Fietzek UM, Heitmann S, Walter U, Jost WH. Relevance of sonography for botulinum toxin treatment of cervical dystonia: an expert statement. *Journal of Neural Transmission*. 2014;122:1457–63.
54. Fietzek UM, Nene D, Schramm A, Appel-Cresswell S, Košutzká Z, Walter U i sur. The Role of Ultrasound for the Personalized Botulinum Toxin Treatment of Cervical Dystonia. *Toxins*. 2021;13:365.
55. Cloud LJ, Jinnah H. Treatment strategies for dystonia. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2009;11:5–15.
56. Burke RE, Fahn S, Marsden CD. Torsion dystonia: a double-blind, prospective trial of high-dosage trihexyphenidyl. *Neurology*. 1986;36:160-4.
57. Burke RE, Fahn S. Pharmacokinetics of trihexyphenidyl after short-term and long-term administration to dystonic patients. *Annals of Neurology*. 1985;18:35–40.
58. Greene P. Baclofen in the Treatment of Dystonia. 1992;15:276–88.
59. Greene P, Shale H, Fahn S. Analysis of open-label trials in torsion dystonia using high dosages of anticholinergics and other drugs. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*. 1988;3:46–60.
60. Fletcher NA, Thompson PD, Scadding JW, Marsden CD. Successful treatment of childhood onset symptomatic dystonia with levodopa. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 1993;56:865–7.
61. Coleman M. Preliminary remarks on the L-dopa therapy of dystonia. *Neurology*. 1970 Nov 1;20:114–21.
62. Barrett RE, Yahr MD, Duvoisin RC. Torsion dystonia and spasmodic torticollis results of treatment with L-dopa. *Neurology*. 1970;20:107–13.
63. Mandell S. The treatment of dystonia with L-dopa and haloperidol. *Neurology*. 1970;20:103–6.
64. Greene P, Shale H, Fahn S. Experience with high dosages of anticholinergic and other drugs in the treatment of torsion dystonia. *Advances in Neurology*. 1988;50:547–56.
65. Jiménez-Jiménez FJ, García-Ruiz PJ, Molina JA. Drug-Induced Movement Disorders. *Drug Safety*. 1997;16:180–204.
66. Zuddas A, Cianchetti C. Efficacy of risperidone in idiopathic segmental dystonia. *Lancet (London, England)*. 1996;347:127–8. Available from:
67. Barbara Illowsky Karp, Goldstein SR, Chen R, Samii A, Bara-Jimenez W, Hallett M. An open trial of clozapine for dystonia. *Movement disorders*. 1999;14:652–7.

68. Arce CA. Selective denervation in cervical dystonia. In: Stacey MA, editor. *Handbook of dystonia*. Informa Healthcare USA, Inc; New York: 2007. pp. 381–92. Thorough review of selective denervation.
69. Narayan RK, Loubser PG, Jankovic J, Donovan WH, Bontke CF. Intrathecal baclofen for intractable axial dystonia. *Neurology*. 1991;41:1141–2.
70. Ford B, Greene P, Louis ED, Petzinger GM, Bressman SB, Goodman R i sur. Use of Intrathecal Baclofen in the Treatment of Patients With Dystonia. 1996;53:1241–6.
71. van Hilten BJ, van de Beek WJT, Hoff JI, Voormolen JHC, Delhaas EM. Intrathecal Baclofen for the Treatment of Dystonia in Patients with Reflex Sympathetic Dystrophy. *New England Journal of Medicine*. 2000;343:625–30.
72. Ostrem JL, Starr PA. Treatment of dystonia with deep brain stimulation. *Neurotherapeutics*. 2008;5:320–30.
73. Cooper IS. 20-year followup study of the neurosurgical treatment of dystonia musculorum deformans. *Advances in Neurology*. 1976;14:423–52.
74. Tsui JK, Eisen A, Mak E, Carruthers J, Scott A, Calne DB. A pilot study on the use of botulinum toxin in spasmodic torticollis. *Can J Neurol Sci*. 1985;12:314-6.
75. Tsui J, Jon Stoessl A, Eisen A, Calne S, Calne D. Double – blind study of botulinum toxin in spasmodic torticollis. *The Lancet*, 328, 245–247
76. Yumpu.com. Toronto Western Spasmodic Torticollis Rating Scale Toronto[Internet]. New York. yumpu.com; 1994 [citirano 4.srpnja 2024]. Available from: <https://www.yumpu.com/en/document/read/29595711/toronto-western-spasmodic-torticollis-rating-scale-toronto->
77. Cano SJ, Warner TT, Linacre JM, Bhatia KP, Thompson AJ, Fitzpatrick R i sur. Capturing the true burden of dystonia on patients: The Cervical Dystonia Impact Profile (CDIP-58). *Neurology*. 2004;63:1629–33.
78. Cano SJ, Hobart JC, Edwards M, Fitzpatrick R, Bhatia K, Thompson AJ i sur. CDIP-58 can measure the impact of botulinum toxin treatment in cervical dystonia. *Neurology*. 2006;67:2230–2.
79. FDA-NIH Biomarker Working Group. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource [Internet]. New York. Nih.gov. Food and Drug Administration (US); 2016. [citirano 4.srpnja 2024]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326791/>
80. FDA. Fast Track, Breakthrough Therapy, Accelerated Approval, Priority Review [Internet]. New York. U.S. Food and Drug Administration. 2019. [citirano 4.srpnja

- 2024]. Dostupno na: <https://www.fda.gov/patients/learn-about-drug-and-device-approvals/fast-track-breakthrough-therapy-accelerated-approval-priority-review>
81. Califf RM. Biomarker definitions and their applications. *Experimental Biology and Medicine*. 2018;243:213–21.
  82. Freedland SJ, Moul JW. Prostate Specific Antigen Recurrence After Definitive Therapy. 2007;177:1985–91.
  83. Gundogdu F, Soyly F, Erkan L, Tatli O, Mavi S, Yavuzcan A. The role of serum CA-125 levels and CA-125 tissue expression positivity in the prediction of the recurrence of stage III and IV epithelial ovarian tumors (CA-125 levels and tissue CA-125 in ovarian tumors). *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2010;283:1397–402.
  84. AASLD. AASLD/IDSA HCV guidance panel. Recommendations for testing, managing, and treating hepatitis C. [Internet]. AASLD; 2020 [citirano 4.srpnja 2024.]. Dostupno na: <https://www.hcvguidelines.org/references/aasldidsa-2020>
  85. Group FNBW. Monitoring Biomarker [Internet]. [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Food and Drug Administration (US); 2021. [citirano 4.srpnja 2024.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK402282/>
  86. Holbrook A, Schulman S, Witt DM, Vandvik PO, Fish J, Kovacs MJ i sur. Evidence-Based Management of Anticoagulant Therapy. *Chest*. 2012;141:e152Se184S.
  87. National Cancer Institute. Pharmacodynamic biomarkers [Internet]. National Cancer Institute; 2013. [citirano 4.srpnja 2024.]. Dostupno na: [https://next.cancer.gov/developmentresources/pd\\_biomarker.htm](https://next.cancer.gov/developmentresources/pd_biomarker.htm)
  88. Scagliotti G, Hanna N, Fossella F, Sugarman K, Blatter J, Peterson P i sur. The differential efficacy of pemetrexed according to NSCLC histology: a review of two Phase III studies. *The Oncologist*. 2009;14:253–63.
  89. Sousa-Pinto B, Pinto-Ramos J, Correia C, Gonçalves-Costa G, Gomes L, Gil-Mata S i sur. Pharmacogenetics of abacavir hypersensitivity: A systematic review and meta-analysis of the association with HLA-B\*57:01. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136:1092-4.e3.
  90. FDA-NIH Biomarker Working Group. Prognostic Biomarker [Internet]. [Nih.gov](http://Nih.gov). Food and Drug Administration (US); 2016. [citirano 4.srpnja 2024.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK402289/>
  91. Grantham JJ, Torres VE, Chapman AB, Guay-Woodford LM, Bae KT, King BF i sur. Volume progression in polycystic kidney disease. *The New England journal of medicine*. 2006;354:2122–30.

92. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology*. 2015;40:1.
93. Group FNBW. Safety Biomarker [Internet]. Food and Drug Administration (US); 2016. [citirano 4.srpnja 2024.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK402287/>
94. Senior JR. Evolution of the Food and Drug Administration Approach to Liver Safety Assessment for New Drugs: Current Status and Challenges. *Drug Safety*. 2014;37:9–17.
95. Wasung ME, Chawla LS, Madero M. Biomarkers of renal function, which and when? *Clinica Chimica Acta*. 2015;438:350–7.
96. Food and Drug Administration, HHS. International Conference on Harmonisation; guidance on E14 Clinical Evaluation of QT/QTc Interval Prolongation and Proarrhythmic Potential for Non-Antiarrhythmic Drugs; availability. Notice. *Fed Regist*. 2005;70:61134-5.
97. Hansen KB, Wollmuth LP, Bowie D, Furukawa H, Menniti FS, Sobolevsky AI i sur. Structure, function, and pharmacology of glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev*. 2021;73:298-487.
98. Paoletti P. Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *Eur J Neurosci*. 2011;33:1351-65.
99. Lau CG, Zukin RS. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nature Reviews Neuroscience*. 2007;8:413–26.
100. Kleckner NW, Dingledine R. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science*. 1988;241:835-7.
101. Clements JD, Westbrook GL. Activation kinetics reveal the number of glutamate and glycine binding sites on the N-methyl-D-aspartate receptor. *Neuron*. 1991;7:605-13.
102. Chatterton JE, Awobuluyi M, Premkumar LS, Takahashi H, Talantova M, Shin Y, Cui J, Tu S, Sevarino KA, Nakanishi N, Tong G, Lipton SA, Zhang D. Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature*. 2002;415:793-8.
103. S. Pachernegg, N. Strutz – Seeböhm i M. Hollmann. GluN3 subunit – containing NMDA receptors: not just one – trick ponies. *Trends in Neurosciences*. 2011;35:240-9.
104. Hansen KB, Yi F, Perszyk RE, Menniti FS, Traynelis SF. NMDA Receptors in the Central Nervous System. *Methods in Molecular Biology*. 2017;1677:1–80.



105. Geiger JR, Lübke J, Roth A, Frotscher M, Jonas P. Submillisecond AMPA receptor-mediated signaling at a principal neuron-interneuron synapse. *Neuron*. 1997;18:1009-23.
106. Sah P, Hestrin S, Nicoll RA. Properties of excitatory postsynaptic currents recorded in vitro from rat hippocampal interneurons. *J Physiol*. 1990;430:605-16.
107. Lerma J, Paternain AV, Naranjo JR, Mellström B. Functional kainate-selective glutamate receptors in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:11688-92.
108. Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*. 1984;307:462-5.
109. Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB. Voltage-dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature*. 1984;309:261-3.
110. Seeburg PH, Burnashev N, Köhr G, Kuner T, Sprengel R, Monyer H. The NMDA receptor channel: molecular design of a coincidence detector. *Recent Prog Horm Res*. 1995;50:19-34.
111. Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK i sur. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev*. 2010;62:405-96. Erratum in: *Pharmacol Rev*. 2014;66:1141.
112. Holtmaat A, Svoboda K. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nature Reviews Neuroscience*. 2009;10:647–58.
113. Granger AJ, Nicoll RA. Expression mechanisms underlying long-term potentiation: a postsynaptic view, 10 years on. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2014;369:20130136.
114. Citri A, Malenka RC. Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms. *Neuropsychopharmacology*. 2007;33:18–41.
115. Morris RG. NMDA receptors and memory encoding. *Neuropharmacology*. 2013;74:32-40.
116. Vyklicky V, Korinek M, Smejkalova T, Balik A, Krausova B, Kaniakova M, et al. Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiological Research*. 2014;S191–203.
117. Oliet SH, Mothet JP. Regulation of N-methyl-D-aspartate receptors by astrocytic D-serine. *Neuroscience*. 2009;158:275-83.
118. Mothet JP, Le Bail M, Billard JM. Time and space profiling of NMDA receptor co-agonist functions. *J Neurochem*. 2015;135:210-25.

119. Papouin T, Ladépêche L, Ruel J, Sacchi S, Labasque M, Hanini M, Groc L, Pollegioni L, Mothet JP, Oliet SH. Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell*. 2012;150:633-46.
120. Bergeron R, Meyer TM, Coyle JT, Greene RW. Modulation of N-methyl-D-aspartate receptor function by glycine transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:15730-4.
121. Billups D, Attwell D. Active release of glycine or D-serine saturates the glycine site of NMDA receptors at the cerebellar mossy fibre to granule cell synapse. *Eur J Neurosci*. 2003;18:2975-80.
122. Paoletti P, Bellone C, Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14 :383–400.
123. Mody I, MacDonald JF. NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca<sup>2+</sup> release. *Trends Pharmacol Sci*. 1995;16:356-9.
124. Wroge CM, Hogins J, Eisenman L, Mennerick S. Synaptic NMDA Receptors Mediate Hypoxic Excitotoxic Death. *Journal of Neuroscience*. 2012;32:6732–42.
125. Olney JW, Sharpe LG. Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science*. 1969;166:386-8.
126. Hallett PJ, Standaert DG. Rationale for and use of NMDA receptor antagonists in Parkinson's disease. *Pharmacology & Therapeutics*. 2004;102:155-174.
127. Javitt DC. Glutamate and schizophrenia: phencyclidine, N-methyl-D-aspartate receptors, and dopamine-glutamate interactions. *Int Rev Neurobiol*. 2007;78:69-108.
128. Farber NB. The NMDA receptor hypofunction model of psychosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;1003:119-30.
129. Moghaddam B, Krystal JH. Capturing the angel in "angel dust": twenty years of translational neuroscience studies of NMDA receptor antagonists in animals and humans. *Schizophr Bull*. 2012;38:942-9.
130. Sharma G, Stevens CF. Interactions between two divalent ion binding sites in N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Nov;93:14170-5.
131. Kawajiri S, Dingledine R. Multiple structural determinants of voltage-dependent magnesium block in recombinant NMDA receptors. *Neuropharmacology*. 1993;32:1203-11.
132. Paoletti P, Ascher P, Neyton J. High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. *J Neurosci*. 1997;17:5711-25.

133. Zarate CA Jr, Singh JB, Carlson PJ, Brutsche NE, Ameli R, Luckenbaugh DA i sur. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch Gen Psychiatry*. 2006;63:856-64.
134. Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, Charney DS, Krystal JH. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry*. 2000;47:351-4.
135. Murrough JW, Soleimani L, DeWilde KE, Collins KA, Lapidus KA, Iacoviello BM i sur. Ketamine for rapid reduction of suicidal ideation: a randomized controlled trial. *Psychol Med*. 2015;45:3571-80.
136. Zarate CA Jr, Brutsche NE, Ibrahim L, Franco-Chaves J, Diazgranados N, Cravchik A, Selter J, Marquardt CA, Liberty V, Luckenbaugh DA. Replication of ketamine's antidepressant efficacy in bipolar depression: a randomized controlled add-on trial. *Biol Psychiatry*. 2012;71:939-46.
137. Rodriguez CI, Kegeles LS, Levinson A, Feng T, Marcus SM, Vermes D, Flood P, Simpson HB. Randomized controlled crossover trial of ketamine in obsessive-compulsive disorder: proof-of-concept. *Neuropsychopharmacology*. 2013;38:2475-83.
138. Feder A, Parides MK, Murrough JW, Perez AM, Morgan JE, Saxena S, Kirkwood K, Aan Het Rot M, Lapidus KA, Wan LB, Iosifescu D, Charney DS. Efficacy of intravenous ketamine for treatment of chronic posttraumatic stress disorder: a randomized clinical trial. *JAMA Psychiatry*. 2014;71:681-8.
139. Sanacora G, Smith MA, Pathak S, Su HL, Boeijinga PH, McCarthy DJ, Quirk MC. Lanicemine: a low-trapping NMDA channel blocker produces sustained antidepressant efficacy with minimal psychotomimetic adverse effects. *Mol Psychiatry*. 2014;19:978-85.
140. Akazawa C, Shigemoto R, Bessho Y, Nakanishi S, Mizuno N. Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. *J Comp Neurol*. 1994;347:150-60.
141. Watanabe M, Inoue Y, Sakimura K, Mishina M. Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport*. 1992;3:1138-40.
142. Chiochetti AG, Yousaf A, Bour HS, Haslinger D, Waltes R, Duketis E, et al. Common functional variants of the glutamatergic system in Autism spectrum disorder with high and low intellectual abilities. *Journal of Neural Transmission*. 2017;125:259–71.
143. Millard SP, Shofer J, Braff D, Calkins M, Cadenhead K, Freedman R i sur. Prioritizing schizophrenia endophenotypes for future genetic studies: An example using data from the COGS-1 family study. *Schizophr Res*. 2016;174:1-9.

144. Domino EF, Luby ED. Phencyclidine/schizophrenia: one view toward the past, the other to the future. *Schizophr Bull.* 2012;38:914-9.
145. Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD i sur. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry.* 1994;51:199–214
146. Xu K, Krystal JH, Ning Y, Chen da C, He H, Wang D i sur. Preliminary analysis of positive and negative syndrome scale in ketamine-associated psychosis in comparison with schizophrenia. *J Psychiatr Res.* 2015;61:64–72.
147. Hansen KB, Yi F, Perszyk RE, Menniti FS, Traynelis SF. NMDA receptors in the central nervous system. *Methods Mol Biol.* 2017;1677:1-80.
148. EpiPM Consortium. A roadmap for precision medicine in the epilepsies. *Lancet Neurol.* 2015;14:1219-28.
149. Strehlow V, Heyne HO, Vlaskamp DRM, Marwick KFM, Rudolf G, de Bellescize J i sur. GRIN2A study group. GRIN2A-related disorders: genotype and functional consequence predict phenotype. *Brain.* 2019;142:80-92.
150. Lucas DR, Newhouse JP. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch Ophthalmol.* 1957;58:193-201.
151. Choi DW, Maulucci-Gedde M, Kriegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci.* 1987;7:357-68.
152. Milnerwood AJ, Gladding CM, Pouladi MA, Kaufman AM, Hines RM, Boyd JD i sur. Early increase in extrasynaptic NMDA receptor signaling and expression contributes to phenotype onset in Huntington's disease mice. *Neuron.* 2010;65:178-90.
153. Dalmau J, Armangué T, Planagumà J, Radosevich M, Mannara F, Leypoldt F i sur. An update on anti-NMDA receptor encephalitis for neurologists and psychiatrists: mechanisms and models. *The Lancet Neurology.* 2019;18:1045–57.
154. Hughes EG, Peng X, Gleichman AJ, Lai M, Zhou L, Tsou R, Parsons TD, Lynch DR, Dalmau J, Balice-Gordon RJ. Cellular and synaptic mechanisms of anti-NMDA receptor encephalitis. *J Neurosci.* 2010;30:5866-75.
155. Balint B. Isolated Dystonia with NMDAR Antibodies: Expanding the Phenotype or Illustrating the Intricacies of Antibody Testing? *Movement Disorders Clinical Practice.* 2023;10:677–9.

156. Mitra AD, Afify A. Ovarian teratoma associated Anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis: a difficult diagnosis with a favorable prognosis. *Autops Case Rep.* 2018;8:e2018019.
157. Son DK, Cho SM, Ryu HU, Shin BS, Kang HG. Anti-NMDAR encephalitis with bilateral basal ganglia MRI lesions at a distance of time: a case report. *BMC Neurology.* 2022;22:121.
158. Norioka R, Kumada S, Tobisawa S, Tsuyusaki Y, Isozaki E. Clinical characteristics of children and adults with anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis. *Clin Neurol Neurosurg.* 2020;196:106015.
159. Armangue T, Leypoldt F, Málaga I, Raspall-Chaure M, Marti I, Nichter C, et al. Herpes simplex virus encephalitis is a trigger of brain autoimmunity. *Annals of Neurology.* 2014;75:317–23.
160. Nosadini M, Mohammad SS, Corazza F, Ruga E, Kavitha Kothur, Giorgio Perilongo, et al. Herpes simplex virus-induced anti-N-methyl-d-aspartate receptor encephalitis: a systematic literature review with analysis of 43 cases. 2017;59:796–805.
161. ELK Biotechnology CO., Ltd. Human GRIN1(Glutamate Receptor, Iontropic,N-Methyl-D-Aspartate 1) ELISA Kit [Internet]. Wuhan. ELK Biotechnology; 2024. [citirano 4.srpnja 2024.]. Dostupno na: <https://www.elkbiotech.com/pro/ELK5387>
162. Grütz K, Klein C. Dystonia updates: definition, nomenclature, clinical classification, and etiology. *J Neural Transm (Vienna).* 2021;128:395-404.
163. Lungu C, Tarulli AW, Tarsy D, Mongiovi P, Vanderhorst VG, Rutkove SB. Quantifying muscle asymmetries in cervical dystonia with electrical impedance: a preliminary assessment. *Clin Neurophysiol.* 2011;122:1027-31.
164. Balint B, Vincent A, Meinck HM, Irani SR, Bhatia KP. Movement disorders with neuronal antibodies: syndromic approach, genetic parallels and pathophysiology. *Brain.* 2018;141:13-36.
165. Steiner J, Walter M, Glanz W, Sarnyai Z, Bernstein HG, Vielhaber S i sur. Increased prevalence of diverse N -Methyl-D-Aspartate Glutamate Receptor antibodies in patients with an initial diagnosis of schizophrenia. *JAMA Psychiatry.* 2013;70:271.
166. Kronzer VL, Bridges SL Jr, Davis JM 3rd. Why women have more autoimmune diseases than men: An evolutionary perspective. *Evol Appl.* 2020;14:629-33.

## **8. SAŽETAK**

**Cilj istraživanja:** Usporediti serumske koncentracije anti-NMDAR antitijela kod bolesnika s cervikalnom distonijom prije i poslije injekcije botulinum toksina uzevši u obzir duljinu trajanja bolesti, spol, i subjektivne procjene stanja bolesnika nakon primjene botulinum toksina.

**Ispitanici i postupci:** Uključilo se jedanaestero oboljelih od cervikalne distonije. Prosječna je dob ispitanika  $67,36 \pm 11,41$ . Cervikalna distonija sudionika studije prosječno traje  $16,44 \pm 14,35$ . Sedam je ispitanika kontinuirano dulji vremenski interval uzimalo botulinum toksin, dok je dvoje prvi put uzelo botoks za liječenje cervikalne distonije, jedna je osoba primila dvije injekcije botoksa. Netom prije ili poslije neurološkoga pregleda uzimao se serum nakon čega se ispitanicima injicirao botulinum toksin. Sljedeći se uzorak seruma prikupio dva mjeseca poslije botulinum toksina. Serumska se koncentracija anti – NMDAR antitijela izmjerila korištenjem Human GRIN1 (Glutamate Receptor, Ionotropic, N-Methyl-D-Aspartate 1) ELISA Kit (ELK5387). Serumske su koncentracije anti – NMDAR antitijela izmjerene prije injekcije botoksa i dva mjeseca poslije injekcije botulinum toksina. Usporedilo se koncentracije među spolovima. Nastojalo se dovesti u korelaciju promjene serumske koncentracije antitijela na NMDAR i subjektivni dojam bolesnika o bolesti. Također, nastojalo se utvrditi korelaciju koncentracije anti – NMDAR antitijela i duljine cervikalne distonije. Statistički su značajni rezultati ako je  $P < 0,05$ .

**Rezultati:** 7 (63,64%) su ispitanika žene, 4 (36,36%) su muškarca od ukupno 11. Omjer žena naspram muškaraca jest 1,75:1. 7 je ispitanika uzimalo botulinum toksin dulji vremenski interval, dvoje je prvi put primilo injekciju botulinum toksina, jedan je ispitanik uzeo injekciju botoksa dva puta. Nije se dobilo statistički značajnih razlika uspoređivanjem serumske koncentracije anti – NMDAR antitijela prije i dva mjeseca nakon injekcije botoksa kao ni usporedbom po spolu. Serumska je koncentracija anti – NMDAR antitijela prije injekcije botoksa iznosila  $5,65 \pm 0,97$ , dva mjeseca poslije injekcije botulinum toksina bila je  $8,23 \pm 0,97$ . Prosječna je serumska koncentracija anti – NMDAR antitijela prije botoksa u žena iznosila  $5,9 \pm 2,64$ , a poslije  $7,9 \pm 7,06$ . U muškaraca je prije botoksa bila  $5,23 \pm 450,36$  te poslije  $9,2 \pm 1103,09$ . Iako nije uočen statistički značajan rezultat za povezanost subjektivnoga dojma oboljelih od cervikalne distonije i promjene serumske koncentracije anti – NMDAR antitijela dva mjeseca nakon injekcije botoksa uvidjelo se da oboljeli s jakim subjektivnim poboljšanjem simptoma nakon injekcije botoksa imaju trend smanjenja serumse koncentracije antitijela. Uočen je statistički značajan rezultat između duljine bolesti i prve serumske koncentracije antitijela ( $r=0,653$ ,  $P=0,04$ ). Isto nije primijećeno za drugu serumsku koncentraciju antitijela. Zaključak: Koncentracija anti – NMDAR antitijela se ne razlikuje u serumu između ispitanika

s cervikalnom distonijom prije i dva mjeseca nakon injekcije botulinum toksina. Ne postoji razlika u serumskoj koncentraciji između žena i muškaraca oboljelih od cervikalne distonije. Statistički značajna povezanost nije uočena za subjektivni dojam oboljeloga od cervikalne distonije i promjene serumske koncentracije antitijela, iako ispitanici s jakim poboljšanjem imaju trend smanjenja koncentracije antitijela. Dulje trajanje bolesti pozitivno je povezano s prvom serumskom koncentracijom. Isto se ne može reći za drugu. Potrebna su daljnja istraživanja na većim uzorcima za dokazivanje povezanosti duljine trajanja bolesti i koncentracija anti – NMDAR antitijela te promjene koncentracije anti – NMDAR i povezanost s težinom kliničke slike.



## **9. SUMMARY**

**Objective:** To compare serum concentrations of anti-NMDAR antibodies before and two months after botulinum toxin injection. To determine the association between changes in anti-NMDAR antibody concentrations before and two months after botulinum toxin injection and patients' subjective perception of their cervical dystonia. To compare anti-NMDAR antibody concentrations by sex. To determine the association between the duration of cervical dystonia and anti-NMDAR antibody concentration.

**Methods:** Eleven patients with cervical dystonia were included. The mean age of the participants was  $67.36 \pm 11.41$  years. The participants' cervical dystonia had lasted an average of  $16.44 \pm 14.35$  years. Seven participants had been taking botulinum toxin for a longer period of time, while two were receiving botulinum toxin for the first time to treat their cervical dystonia, and one person had received two botulinum toxin injections. Serum was collected before or after the neurological examination, and the participants were then injected with botulinum toxin. The next serum sample was collected two months later after botulinum toxin injection. Serum concentrations of anti-NMDAR antibodies were measured using the Human GRIN1 (Glutamate Receptor, Ionotropic, N-Methyl-D-Aspartate 1) ELISA Kit (ELK5387). Serum concentrations of anti-NMDAR antibodies were measured before botulinum toxin injection and two months after botulinum toxin injection. Concentrations were compared between sexes. An attempt was made to correlate changes in serum anti-NMDAR antibody concentrations with patients' subjective perception of their disease. An attempt was also made to determine the correlation between anti-NMDAR antibody concentration and the duration of cervical dystonia. Statistical significance was set at  $P < 0.05$ .

**Results:** Seven (63.64%) of the participants were women and 4 (36.36%) were men, for a total of 11 participants. The female-to-male ratio was 1.75:1. Seven participants had been taking botulinum toxin for a longer period of time, two received botulinum toxin injections for the first time, and one participant received two botulinum toxin injections. No statistically significant differences were found in serum anti-NMDAR antibody concentrations before and two months after botulinum toxin injection, or between sexes. The mean serum anti-NMDAR antibody concentration before botulinum toxin injection was  $5.65 \pm 0.97$ , and two months after botulinum toxin injection was  $8.23 \pm 0.97$ . The mean serum anti-NMDAR antibody concentration before botulinum toxin injection in women was  $5.9 \pm 2.64$ , and after was  $7.9 \pm 7.06$ . In men, the mean serum anti-NMDAR antibody concentration before botulinum toxin injection was  $5.23 \pm 450.36$ , and after was  $9.2 \pm 1103.09$ . While no statistically significant result was observed for

the association between patients' subjective perception of cervical dystonia and changes in serum anti-NMDAR antibody concentrations two months after botulinum toxin injection, patients with significant subjective improvement in symptoms after botulinum toxin injection showed a trend towards decreased serum antibody concentrations. A statistically significant result was observed between the duration of illness and the first serum antibody concentration ( $r=0.653$ ,  $P=0.04$ ). This was not observed for the second serum antibody concentration.

**Conclusion:** Serum anti-NMDAR antibody concentrations do not differ between patients before and two months after botulinum toxin injection. There is no difference in serum anti-NMDAR antibody concentrations by sex. No statistically significant association was found between patients' subjective perception of cervical dystonia and changes in serum antibody concentrations, although patients with significant improvement showed a trend towards decreased antibody concentrations. Longer duration of illness is positively associated with the first serum concentration. This cannot be said for the second. Further studies on larger samples are needed to prove the association between disease duration and anti-NMDAR antibody concentrations and the changes in anti-NMDAR concentration and the association with the severity of the clinical picture.

## **10. ŽIVOTOPIS**

Ime i prezime: [REDACTED]

Datum rođenja: [REDACTED]

Mjesto rođenja: [REDACTED]

Državljanstvo: [REDACTED]

Email adresa: [REDACTED]

2006. – 2014. [REDACTED]

2014. – 2018. [REDACTED]

2018. – 2024. [REDACTED]

2018./2019. [REDACTED]

2021./2022. [REDACTED]

2021./2022. [REDACTED]

2022./2023. [REDACTED]

2023. [REDACTED]

2023./2024. [REDACTED]

2024. [REDACTED]

2024. [REDACTED]

2024. [REDACTED]

