

Centralni učinci botulinum toksina tipa A na neurotransmitere i neuronalne markere u kralježničnoj moždini štakora s lokalnim mišićnim spasticitetom

Barišić-Jaman, Mislav

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:200600>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-13**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Mislav Barišić-Jaman

**Centralni učinci botulinum toksina tipa A na
neurotransmitere i neuronalne markere u
kralježničnoj moždini štakora s lokalnim mišićnim
spasticitetom**

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2019.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom dr. sc. Ivice Mataka, u okviru projekta Europskog socijalnog fonda i Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta (HR3.2.01-0178) te je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2017./2018.

POPIS KRATICA

BoNT/A - Botulinum toksin tip A

CGRP - peptid povezan sa kalcitoninskim genom (prema engl., Calcitonin gene-related peptide)

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

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

GABA - gama-aminomaslačna kiselina

GPI - lat. *globus pallidus internus*

HRP - enzim peroksidaze hrena

i.j. - internacionalne jedinice

i.p. - intraperitonealno

im. - intramuskularno

in. - intraneuralno

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

NeuN - protein neuronske jezgre (prema engl., Neuronal nuclei)

NGS - normalni ovčji serum (prema engl., Normal goat serum)

PBST - fosfatno puferirana fiziološka otopina sa tritonom (prema engl., phosphate buffered saline)

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

SNr - lat. *substantia nigra pars reticulata*

SV2-C - glikoprotein sinaptičke vezikule 2C (prema engl., Synaptic Vesicle Glycoprotein 2C)

TeNT - Tetanus toksin

TMB - tetrametilbenzidin

VAMP - membranski protein povezan sa vezikulom (prema engl., Vesicle associated membrane protein)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. POREMEĆAJI POKRETA	1
1.2. TERAPIJSKE MOGUĆNOSTI.....	2
1.3. BOTULINUM TOKSIN	3
1.4. TETANUS TOKSIN.....	3
2. HIPOTEZA	4
3. OPĆI CILJ I SPECIFIČNI CIJEVI RADA.....	4
4. MATERIJALI I METODE.....	5
4.1. Životinje.....	5
4.2. Kemikalije	5
4.3. Tretiranje životinja.....	5
4.4. Bihevioralni testovi motorike	6
4.4.1. Mjerenje otpora na fleksiju gležnja	6
4.4.2. Hodanje na uskoj šipki.....	7
4.4.3. Rota-rod test.....	7
4.4.4. Refleks širenja nožnih prstiju	7
4.5. Žrtvovanje.....	7
4.6. Priprema tkiva	8
4.6.1. Priprema tkiva za imunohistokemiju.....	8
4.6.2. Priprema tkiva za ELISA-u.....	8
4.7. Mjerenje proteina.....	9
4.8. ELISA	9
4.8.1. GABA ELISA	9
4.8.2. Glutamat ELISA.....	10
4.9. STATISTIČKA ANALIZA	10
5. REZULTATI.....	11
5.1. Mišićna hipertoniya izazvana TeNT-om.....	11
5.2. Intramuskularna injekcija BoNT/A smanjuje hipertoniya stražnjeg uda, ali ne poboljšava funkcionalne parametre testova ravnoteže i izdržljivosti	11
5.3. Injekcija BoNT/A u ishijadični živac smanjuje hipertoniya i funkcionalnu upotrebljivost noge u rota-rod testu	13
5.4. TeNT povišuje koncentraciju glutamata u ipsilateralnom ventralnom rogu, dok se koncentracija GABA-e značajno ne mijenja.....	14
5.5. TeNT i BoNT/A ne mijenjaju broj motoneurona u ventralnom rogu.....	15

5.6. Razina SV2C, staničnog akceptora BoNT/A, nije bila promijenjena s intramuskularno primjenjenim TeNT i BoNT/A	18
5.7. TeNT i BoNT/A enzimatski djeluju na svoje sinaptičke mete u ventralnom rogu.....	19
6. RASPRAVA.....	21
7. ZAKLJUČCI.....	23
8. ZAHVALE.....	24
9. POPIS LITERATURE	24
10. SAŽETAK	27
11. SUMMARY	28
12. ŽIVOTOPIS	29

1. UVOD

1.1. POREMEĆAJI POKRETA

Poremećaji pokreta obuhvaćaju niz stanja obilježenih poremećajem izvođenja voljnih ili pojavom nevoljnih pokreta. Dijele su u dvije velike skupine, ovisno radi li se o smanjenju voljne motorike – **hipokinetički poremećaji**, ili o pojavi nevoljnih pokreta – **hiperkinetički poremećaji**. Potonji mogu biti spontani ili nadovezani na voljnu motoriku. Patološki supstrat u objema skupinama jest poremećaj na razini funkcije subkortikalnih jezgara mozga – bazalnih ganglija (Brinar, 2009). Najpoznatiji, a i najčešći predstavnik hipokinetičkih poremećaja je onaj uzrokovan degeneracijom dopaminergičkih neurona supstancije nigre – Parkinsonova bolest, karakterizirana rigidnošću mišića, bradikinezijom, tremorom u mirovanju, gubitkom posturalnih refleksa (Davie, 2008). Sasvim je suprotna klinička slika kod koreje, balizma, distonije, tremora, tika i mioklonusa – predstavnicima hiperkinetičkih poremećaja pokreta. Ovisno o tome javljaju li se nevoljni pokreti u pravilnim razmacima ili ne, razlikujemo među njima ritmične – tremor, te neritmične – tik, koreja, mioklonizmi i dr. Iduće važne odrednice jesu brzina kod neritmičnih te trenutak pojavnosti (u mirovanju ili kod pokušaja izvođenja pokreta) u ritmičnih hiperkinetičkih poremećaja pokreta (Brinar, 2009). Postoje i bolesti u kojih dolazi do preklapanja hiper- i hipokinetičkih poremećaja. Najbolji primjer za ovaj kombinirani poremećaj pokreta je Wilsonova bolest – autosomno recesivan poremećaj metabolizma bakra uslijed čijeg povećanog taloženja u tkivu (pretežno jetri i mozgu) dolazi do nastanka jetrene disfunkcije i neuroloških poremećaja (Pfeiffer, 2007). Jezgre GPi (lat. *globus pallidus internus*) i SNr (lat. *substantia nigra pars reticulata*) glavne su izlazne jezgre bazalnih ganglija. Neurotransmitter njihovih projekcijskih neurona je γ -aminomaslačna kiselina (GABA). Neuronu pokazuju izrazitu spontanu aktivnost i u mirovanju tonički inhibiraju svoje ciljne strukture (motoričke jezgre talamusa, gornje kolikule, nucleus tegmenti pedunculopontinus). Patofiziološka podloga hiperkinetičkih poremećaja pokreta leži upravo u smanjenom djelovanju inhibitornih neuroloških puteva vezanih uz GPi i SNr, dovodeći do dezinhibicije talamokortikalne aktivnosti koja se klinički očituje pojavom nevoljnih pokreta (Walter i Vitek, 2012).

Simptomi poremećaja pokreta, kao što je spastičnost, mogu biti uzrokovani i ozljedom kralježnične moždine i moždanim udarom. Kombinacija dezinhibicije i pojačane depolarizacije stanične membrane, smanjuje akcijski potencijal i pritom povećava aktivnost struktura inerviranih zahvaćenim živcima (Defebvre i Krystkowiak, 2016). U patofiziologiji nastanka simptoma lokalnog spazma glavnu ulogu ima smanjenje inhibicijske kontrole donjih motoneurona koji inerviraju zahvaćene mišiće (Hallet i sur., 2011; LeDoux, 2005). **Ozljede kralježnične moždine** dovode do prekidanja monoaminergičke kontrole aktivnosti donjih motoneurona i smanjenje presinaptičke inhibicije, što uzrokuje pretjeranu aktivaciju donjih motoneurona i posljedično mišićni spazam. **Spasticitet** koji nastaje **uslijed ozljeda gornjih motoneurona** (npr. uslijed traumatskih ozljeda mozga, moždanih udara koji zahvaćaju piramidni put, tumora itd.) prekida komunikaciju gornjih i donjih motoneurona, što je osnova voljne kontrole pokreta.

Neposredno nakon ozljede nastupa period flacidne paralize, a nakon nekog vremena obično se razvije spastična paraliza. S manjkom voljne kontrole donjih motoneurona, dugotrajna denervacija dovodi do deregulacije monoaminergičke kontrole aktivnosti donjih motoneurona preko retikulospinalnog puta, te poremećaja aktivnosti lokalnih neuronalnih krugova u ventralnom rogu, što s vremenom vodi u segmentalnu hiperrefleksiju i spazam (Le Doux, 2005). Kod **distonije**, deregulacija funkcije bazalnih ganglija i malog mozga uzrokuje smetnje senzorno-motoričke kontrole spinalnih refleksa i nenormalne spastičke ko-kontraksije mišića agonista i antagonista, što može zahvatiti samo određene regije (npr. vratne mišiće kod tortikolisa), ili veće dijelove tijela kao kod generalizirane distonije (Hallet i sur., 2011). Abnormalni refleks istežanja je povezan s poremećajem komunikacije senzornih aferentnih vlakana mišićnog vretena i inhibitornih neurona koji reguliraju taj refleks (Rosales i Dressler, 2010).

1.2. TERAPIJSKE MOGUĆNOSTI

U liječenju poremećaja pokreta primjenjuje se široki spektar lijekova s učinkom na centralni živčani sustav i posljedičnim povećanjem voljne ili smanjenjem nevoljne motorike. Antimuskarinski lijekovi djeluju kao inverzni agonisti za muskarinske receptore pomičući ravnotežu prema inaktivnom stanju receptora, koji su inače konstitutivno aktivni. Koriste se u liječenju Parkinsonove bolesti smanjujući tremor i rigidnost, a u manjoj mjeri utječu na bradikineziju (Katzung i sur., 2012).

Mišićni relaksansi kao što je baklofen, agonist GABA_B receptora s učinkom inhibicije spinalnih motoneurona, dovode do ublažavanja spazma mišića. Kliničku primjenu baklofena nalazimo u liječenju multiple skleroze, posljedica cerebrovaskularnih ozljeda, traumatskih paraplegija ili parapareza i sl. Sličan učinak, ali sasvim drugačiji mehanizam djelovanja ima i tizanidin, agonist α_2 receptora u kralježničnoj moždini, primjenjivan u liječenju spazma uzrokovanog cerebralnom paralizom, moždanim udarom, amiotrofične lateralne skleroze (Katzung i sur., 2012).

Tetrabenazin, blokator pohrane monoamina (posebice dopamina) u presinaptičke vezikule, dovodi do smanjenja količine monoamina u sinaptičkoj pukotini i tako ublažava koreju u oboljelih od Huntingtonove bolesti (Katzung i sur., 2012).

Sve više se u praksi primjenjuje i botulinum toksin, proizvod bakterije *Clostridium botulinum*, koji inhibicijom izlučivanja acetilkolina u neuromišićnoj sinapsi izaziva mišićnu relaksaciju. Uz rehabilitacijske metode, primjenjuje se u liječenju oboljelih od cerebralne paralize (Jianjun i sur., 2013), kao i u pacijenata koji su doživjeli moždani udar (Teasell i sur., 2012). Pomaže i u kontroli spasticiteta izazvanog ozljedom kralježnične moždine, djelujući i do 3 mjeseca nakon injekcije (Fried i Fried, 2003). Najširu primjenu u ovom području nalazi u liječenju distonija – blefarospazma, oromandibularne, cervikalne, hemifacijalne distonije i sl. (Münchau i Bhatia, 2000).

1.3. BOTULINUM TOKSIN

Botulinum toksin je proteinski kompleks iz bakterije *Clostridium botulinum* građen od neurotoksičnog dijela i netoksičnih pomoćnih proteina, ukupne molekularne mase od 900 kilodaltona (kDa) . Neurotoksinski dio od 150 kDa se sastoji od teškog (100 kDa) i lakog lanca (50 kDa) međusobno spojenih disulfidnom vezom. Dosad je poznato sedam serotipova botulinum toksina (A-G). Iako svi oni inhibiraju otpuštanje acetilkolina iz živčanih završetaka, razlikuju se u djelovanju na ciljne molekule unutar stanice. Najviše se za terapijske svrhe koristi botulinum toksin tipa A (BoNT/A) (Dressler i Saberi, 2005). U perifernom živčanom sustavu, BoNT pokazuje visok afinitet za kolinergičke motorne i autonomne neurone, ali može ući i u simpatičke i senzorne neurone. Da bi se neurotoksični učinak na ciljne sinaptičke proteine mogao ostvariti, BoNT/A mora ući u stanicu i osloboditi svoj laki lanac u citosol procesima internalizacije i translokacije. To čini tako da se veže za gangliozide i proteinske akceptore na neuronima (SV2C protein). Zatim, nakon procesa internalizacije sinaptičkih vezikula i ulaska BoNT/A neurotoksina u endosomalni odjeljak, dolazi do oslobađanja lakog lanca u citosol sinapse. Laki lanac toksina je o cinku ovisna metaloproteaza koja se veže specifično za SNAP-25 protein (Synaptosomal-associated proteins of 25 kDa) te ga cijepa (Blasi i sur., 1993). Cijepanje SNAP-25 kao dijela SNARE (eng. soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) heterotrimernog proteinskog kompleksa sprječava spajanje vezikula acetilkolina i membrane neurona u području sinapse. Posljedica je nemogućnost egzocitoze acetilkolina , ali i ostalih neurotransmitera (de Paiva, 1999). Botulinum toksin injiciran intramuskularno se transportira do neuromuskularne spojnice te blokira oslobađanje acetilkolina i uzrokuje flacidnu paralizu (Nigam i Nigam, 2010). Osim alfa motoneurona, blokira i gama motoneurone i time smanjuje aktivnost mišićnog vretena što ima veliku ulogu u očuvanju toničkog miotatskog refleksa (Filippi i sur., 1993). Botulinum toksin ima i mogući centralni učinak gdje dolazi retrogradnim transportom, ali se njegova uloga još istražuje (Caleo i sur., 2009). Budući da blokira izlazak acetilkolina iz sinaptičkih završetaka, koristi se kao lijek u raznim neurološkim i autonomnim poremećajima. Ovisno o poremećaju i veličini zahvaćenih mišića, za liječenje se koriste doze između 2 i.j. (kod spazmodičke disfonije) i 1800 i.j. (kod spasticiteta uzrokovanog moždanim udarom) (Santamato, 2015).

1.4. TETANUS TOKSIN

Tetanus toksin (TeNT) je produkt bakterije *Clostridium tetani* i uzročnik simptoma tetanusa. (Hassel, 2013). Po svome je sastavu i strukturi homologan molekuli BoNT, osim što ne sadrži kompleks pomoćnih proteina, pa se cijela molekula od 150 kDa sastoji od teškog i lakog lanca sličnima BoNT. Kao i kod BoNT, laki lanac TeNT je cink-ovisna metaloproteinaza čiji je ciljni protein dio SNARE kompleksa, međutim umjesto SNAP-25 cijepa sinaptobrevin/VAMP (vesicle-associated membrane protein) (Schiavo , 2000). Ušavši u živac, tetanus se retrogradnim transportom prenosi sve do

kralježnične moždine, a čak i do moždanog debla (Blencowe i sur., 2010). Tamo se tetanus toksin transportira preko sinapsi do živčanih završetaka inhibitornih GABA-ergičnih ili glicinergičnih neurona koji kontroliraju aktivnost donjeg motoneurona (Schwab i Thoenen, 1976). U njima uzrokuje inhibiciju egzocitoze GABA-e i glicina dovodeći do hiperaktivnosti donjeg motoneurona, što se očituje povećanom mišićnom aktivnosti u vidu rigiditeta i spazma (Brooks i sur., 1957). Rigidnost je tonička, nevoljna kontrakcija mišića dok su spazmi kratkotrajne kontrakcije mišića koje se mogu uzrokovati senzornom stimulacijom ili ekstenzijom mišića (Hassel, 2013). Tetanus se može podijeliti na generalizirani, neonatalni, lokalni i cefalični. Generalizirani i neonatalni tetanus utječu na cijelo tijelo i vode do opistotonusa te mogu uzrokovati respiratornu insuficijenciju uslijed spazma laringealnih mišića. Lokalni i cefalični tetanus javljaju se u manjem broju slučajeva, imaju manju incidenciju smrtnosti, ali mogu prijeći u generalizirani oblik (Alimuddin, 2010). U ovom istraživanju, koristili smo niske doze TeNT koje uzrokuju lokalni spazam mišića. Zbog svog učinka na smanjenu inhibiciju motoneurona koji inerviraju injicirani mišić, koristili smo ga kao metodu izazivanja lokalnog spazma koja po svom mehanizmu podsjeća na mehanizme nastanka lokalne hipertoničnosti mišića na razini deregulacije inhibitorne i ekscitatorne ravnoteže u ventralnom rogu, opisane u uvodu.

2. HIPOTEZA

Nedavna pretklinička i klinička istraživanja su pokazala mogući terapijski učinak djelovanja BoNT/A na razini centralnih motoneurona (Antonucci i sur., 2008; Matak i sur., 2012). Pretpostavka koju želimo istražiti je da BoNT/A može potaknuti promjene u neravnoteži između ekscitatorne i inhibitorne neurotransmisije na razini kralježnične moždine u životinja s lokalnim mišićnim spazmom izazvanim TeNT.

3. OPĆI CILJ I SPECIFIČNI CIJEVI RADA

Opći cilj istraživanja bio je utvrditi moguće djelovanje BoNT/A na razini centralnih motoneurona smještenih u ventralnim rogovima kralježnične moždine.

Specifični ciljevi rada su:

1. Istraživanje bihevioralnog utjecaja BoNT/A na dugotrajnu spastičnu paralizu m.gastrocnemius stražnje noge štakora izazvanu TeNT.
2. Istražiti mogući centralni učinak BoNT/A na glavne ekscitacijske i inhibicijske neurotransmitore glutamat i GABA-u u ventralnim rogovima kralježnične moždine.
3. Okarakterizirati mjesta enzimskog djelovanja TeNT i BoNT/A u leđnoj moždini imunohistokemijskom analizom VAMP-2 i pocijepanog SNAP-25.

4. Ocijeniti mogući neurotoksični učinak TeNT i BoNT/A na motoneurone u ventralnom rogu.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Životinje

U istraživanju su korišteni štakori soja Wistar (stari 3-4 mjeseca), težine 300-400 g, uzgojeni u vivariju Zavoda za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Pokusi su izvedeni u okviru projekta Europskog socijalnog fonda i Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta (HR3.2.01-0178) za koji je izdana dopusnica Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te odobrenje Ministarstva poljoprivrede RH (EP 24-2/2015). Bihevioralni dio eksperimenta i rukovanje eksperimentalnim životinjama izveli su članovi tima Laboratorija za farmakologiju osposobljeni za rad s pokusnim životinjama. Štakori su držani u uvjetima 12h svjetlo/12h mrak, s neometanim pristupom hrani i vodi.

4.2. Kemikalije

Liofilizirani tetanus toksin (Sigma Aldrich) rekonstituiran je u vehikulumu baziranom na fiziološkoj otopini koja sadrži 2% goveđeg serumskog albumina (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD). TeNT je serijski razrijeđen na koncentraciju od 0.5µg/ml. Alikvot je smrznut u tekućem dušiku i skladišten na -80°C do daljnje uporabe. Neposredno prije iniciranja TeNT, alikvoti su odmrznuti i dalje razrijeđeni vehikulumom da bi se dobila potrebna koncentracija. Liofilizirani komercijalni pripravak BoNT/A (Botox®, Allergan, Irvine, CA, USA) je rekonstituiran u fiziološkoj otopini, kako bi se dobilo potrebno razrjeđenje.

4.3. Tretiranje životinja

Kako bi se omogućila precizna injekcija TeNT-a u traženi dio m. gastrocnemius, štakori su anestetizirani ketamin/ksilazinom (70/7 mg/kg i.p.). Upotrebom 0-50 µl Hamiltonove šprice povezane s jednokratnim iglicama od 0.45 mm x 16 mm, štakori su perkutano injektirani s 20 µl otopine TeNT (1.5 ng toksina). 20 µl TeNT otopine podijeljeno je za 2 mjesta ubrizgavanja (svaka od po 10 µl) u lateralni i medijalni trbuh m. gastrocnemius. Doza TeNT-a je izabrana na temelju prijašnjih eksperimenata koji pokazuju da doza niža od 10 ng ne izaziva sistemsko toksično djelovanje kod štakora (Mathews i sur., 2014).

Intramuskularni BoNT/A (5 U/kg ukupne doze) slično je injektiran u srednji i bočni trbuh m. gastrocnemius podjelom injektiranog volumena u dva dijela. Za intraneuralnu injekciju BoNT/A/fiziološke otopine u n. ischiadicus napravljen je lateralni rez na bedru štakora. N. ischiadicus

je prikazan tupom disekcijom kroz mišiće bedra, a BoNT/A (5 U/kg, 5 μ l) polagano ubrizgavan u živac Hamilton # 701 (Hamilton, Bonadouz, Švicarska) injekcijskom iglom. Vrh igle vođen je 1 centimetar duž živca kako bi se spriječilo moguće curenje BoNT/A na mjestu uboda u epineuriju živca. Osim toga, komad parafilma je smješten ispod živca (Matak i sur., 2011). Vrh igle držao se na mjestu još 2 minute prije pažljivog izvlačenja. Nakon 2 minute, parafilm je uklonjen, živac vraćen u svoj anatomski položaj, a koža zašivena. Doza lokalno primijenjenog BoNT/A (intramuskularne i intraneuralne injekcije) od 5 U/kg (1 U označava mišju LD50 dozu, što sadrži 48 pg komercijalnog farmakološkog pripravka) daleko je ispod doze koja inducira sistemske učinke kod štakora (Cui i sur., 2004).

Ekperiment 1: Učinak intramuskularnog BoNT/A na mišićnu hipertoniju uzrokovanu TeNT-om.

Životinje su injicirane u m.gastrocnemius 1.5 ng TeNT/vehikulumom, a nakon 7 dana u ipsilateralni mišić s BoNT/A ili fiziološkom otopinom. Bihevioralni motorni parametri su mjereni na dan 0 (prije injekcije TeNT), dan 7 post TeNT (prije injekcije BoNT/A), dan 8 post TeNT (dan 1 post BoNT/A), dan 10 post TeNT (dan 3 post BoNT/A) i dan 13 (dan 6 post BoNT/A).

Ekperiment 2: Učinak intraneuralne injekcije BoNT/A u n. ischiadicus na mišićnu hipertoniju uzrokovanu TeNT-om. Životinje injicirane u m.gastrocnemius s 1.5 ng TeNT/vehikulumom su injicirane u živac s BoNT/A (5 U/kg//5 μ l)/fiziološkom otopinom 7 dana nakon TeNT.

Bihevioralni motorni parametri su mjereni na dan 0 (prije injekcije TeNT), dan 1 post TeNT, dan 3 post TeNT, dan 7 post TeNT (prije injekcije BoNT/A), dan 10 post TeNT (dan 3 post BoNT/A), dan 12 post TeNT (dan 5 post fiziološka otopina/BoNT/A) i dan 14 (dan 7 post BoNT/A).

4.4. Bihevioralni testovi motorike

4.4.1. Mjerenje otpora na fleksiju gležnja

Budući da je najjasniji simptom hipertonije izazvane TeNT-om rigidna ekstenzija šape u odnosu na tibiju, dizajniran je jednostavan i konzistentan test za ispitivanje rigiditeta zgloba gležnja. Životinje su pažljivo držane rukom oko trupa i leđa, a testirana noga je nježno pritisnuta tabanom šape na povišenu pravokutnu platformu (1.5 x 4 cm) zalijepljenu na površinu digitalne vage, da bi se postigla dorzifleksija tibiotarznog zgloba od 90 °. Da bi se spriječio utjecaj početnog pritiska od strane eksperimentatora koji drži životinju, pritisak je olakšan do te mjere gdje bi daljnje podizanje životinje dignulo tibiotarzalni kut iznad 90°. Tada je s digitalnog prikaza očitana težina u gramima koja je postignuta pritiskom šape. Da bi se postigla mirnoća kod mjerenja, životinje su navikavane na ruku eksperimentatora kroz 3 neovisna treninga prije početka eksperimentalnih mjerenja. Prije pokusa i u kontrolnih životinja koje nisu tretirane s TeNT stražnja šapa je bila opuštana, a sila otpora na dorzifleksiju stalno malena (oko 10-20 g).

4.4.2. Hodanje na uskoj šipki

Životinje su vježbale prelazak horizontalno položene uske šipke široke 2.5 cm i dugačke 100 cm, odignute 40 cm od tla. Šipka povezuje malu otvorenu platformu (10x 10 cm) izloženu jakom svjetlu sa zaštićenom tamnom platformom (25 x 25 cm), stijenkama obojanim u crno i pokrivenom poklopcem. Šipka je označena na oba kraja na udaljenosti od 10 cm od platformi, a vrijeme prelaska životinja je mjereno samo između dvije oznake, budući da su životinje uobičajeno oklijevale prije napuštanja izložene platforme i prije ulaska u tamnu platformu. Vrijeme prelaska je smatrano valjanim samo ako životinja nije zastala tijekom prelaska ili izgubila ravnotežu. Životinje su brzo naučile prelaziti sa svijetle u tamnu platformu zbog averzije na svjetlo. Nakon indukcije eksperimentalnog rigiditeta, životinje su naučile kompenzirati neravnotežu zbog nepravilno položenih udova i prelaziti platformu bez teškoća. Vrijeme prelaska ovih životinja je dulje u odnosu na kontrolnu skupinu.

4.4.3. Rota-rod test

Životinje su trenirane održavati ravnotežu na rota-rod uređaju s okruglom šipkom promjera 8 cm i vrtnjom na konstantnoj brzini od 10 okretaja u minuti. Test po životinji je bio ograničen na najviše 120 sekundi.

4.4.4. Refleks širenja nožnih prstiju

Refleks je mjeran prema postupku razvijenom za miševe i štakore (Broide, 2013). Test se sastoji od podizanja šapice s kontaktne površine tla, što kod štakora inducira refleksno širenje (abdukciju) prstiju. Digitalni abdukcijski skor (eng. Digital abduction score - DAS) nožnih prstiju se definira kao: 0= razdvajanje svih prstiju; 1= razdvajanje 4 prsta; 2= razdvajanje 3 prsta; 3= razdvajanje 2 prsta; 4= svi prsti skupljeni.

4.5. Žrtvovanje

Životinje su žrtvovane u dubokoj anesteziji (ketamin 70 mg/kg; ksilazin 7 mg/kg i.p.), 13. ili 14. dana od tretmana s TeNT. Životinje iz eksperimenta 1 su žrtvovane transkardijalnom perfuzijom s fiziološkom otopinom i fiksativom koji se sastoji od 4% puferiranog paraformaldehida. Nakon disekcije, tkivo leđne moždine je stavljeno u 15 % otopinu saharoze u puferiranom paraformaldehidu na 24 sata, a nakon toga tkivo je stavljeno u otopinu 30 % saharoze u fosfatno puferiranoj fiziološkoj otopini (PBS). Nakon potonuća, tkivo je izvađeno i pohranjeno u frižider na -80°C. Kod eksperimenta 2 dekapitiranim životinjama je disekcijom izvađena lumbalna kralježnična moždina. Uzorci su potom stavljeni u tekući dušik, a zatim pohranjeni na -80°C.

4.6. Priprema tkiva

4.6.1. Priprema tkiva za imunohistokemiju

Uzorci kralježnične moždine su izrezani na kriostatu (Leica, Wetzlar, Njemačka; debljina presjeka 40 µm) i uzeti za imunohistokemijsko bojanje. Presjeci su prvotno tri puta isprani u PBST (PBS sa 0.25% Triton X-100), zatim stavljeni na 1h u otopini za blokiranje nespecifičnog vezanja koja sadrži 10% NGS (Normal Goat Serum) u PBST. Na kraju su inkubirani preko noći (4°C) s primarnim protutijelom razrijeđenim u 1% NGS. Idućeg dana tri puta su isprani u PBST te inkubirani s odgovarajućim sekundarnim fluorescentnim protutijelom 2h na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon ispiranja u PBST, presjeci su postavljeni na stakalca u odgovarajućem mediju (Fluoromount, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD). Presjeci su pregledani i snimljeni na epifluorescentnom mikroskopu Olympus s kamerom DP-70 (Olympus, Tokyo, Japan) i CellSense Dimension software-om (Olympus, Tokyo, Japan).

Tablica 1. Prikaz neuronalnih markera rađenih u imunohistokemiji, vrste i razrjeđenja korištenog sekundarnog protutijela te inkubacije.

	PROTUTIJELO	RAZRJEĐENJE	INKUBACIJA
VAMP-2 (Synaptic Systems)	mišje	1:500 i 1:1000	sobna temperatura
SNAP-25 (pocijepani) (Ornella Rossetto, Padova)	mišje	1:1000	sobna temperatura
SV2-C (Millipore)	mišje	1:1000	sobna temperatura, +4°C
CGRP (Sigma)	kuniće	1:10000	+4°C
NeuN (Millipore)	mišje	1:1000	+4°C
Goat anti rabbit Alexa 555 (konjugirano sekundarno protutijelo) (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD)	kozje	1:400-1:500	sobna temperatura
Goat anti mouse Alexa 555 (konjugirano sekundarno protutijelo) (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD)	kozje	1:400-1:500	sobna temperatura
Goat anti mouse Alexa 488 (konjugirano sekundarno protutijelo) (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD)	kozje	1:400-1:500	sobna temperatura

4.6.2. Priprema tkiva za ELISA-u

Prvotno je određena razina L4/L5 kralježnične moždine štakora. Segment je izrezan skalpelom, a za analizu je uzet ipsilateralni (tretirani, desni) ventralni rog, te kontralateralni (netretirani, lijevi) ventralni rog. Uzorci su uklopljeni u hladni PBS te podvrgnuti homogenizaciji u ultrazvučnom sonikatoru (Ultrasonic Cell Disruptor, Microson). Homogenat je centrifugiran 10' na 10000 okretaja u minuti

(Biofuge Fresco, Heraeus Instruments). Pipetom je uzet supernatant te stavljen u Eppendorf epruvete i pohranjen u hladnjak na -80°C do daljnje upotrebe.

4.7. Mjerenje proteina

Pripremljenim uzorcima su, prije izvođenja samog postupka ELISA-e, izmjerene koncentracije proteina metodom mjerenja proteina po Lowryju. Metoda se zasniva na reakciji Cu^{2+} sa peptidnom vezom proteina u lužnatom mediju što dovodi do redukcije Cu^{2+} u Cu^{+} . Dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa (reagens: destilirana voda u razrjeđenju 1:2), u reakciji sa Cu^{+} -protein kompleksom, dolazi do plavog obojenja. Koncentracija proteina je izmjerena pomoću absorbancije izmjerene na apsorpcijskom spektrofotometru (Iskra, Ljubljana, Slovenija) (valna duljina 450 nm).

4.8. ELISA

Kompetitivna ELISA (Kompetitivni imunoenzimski test) djeluje na principu kompetitivnog vezanja između antigena uzorka i antigena adsorbiranog na dno jažice. Neoznačeno protutijelo se inkubira zajedno s antigenom uzorka. Kompleks antigen uzorka-protutijelo se potom dodaje na ploču s jažicama presvučenim antigenom. Slijedi ispiranje kako bi se nevezana protutijela uklonila. Što je više antigena u samom uzorku, to će više nastati antigen uzorka-protutijelo kompleksa, što će smanjiti broj nevezanih protutijela slobodnih za vezanje na antigen u jažicama (princip kompeticije). Potom se dodaje sekundarno protutijelo, specifično za primarno protutijelo, na koje je vezan enzim. U idućem koraku dodaje se enzimski supstrat te dolazi do promjene boje u jažicama.

4.8.1. GABA ELISA

GABA ELISA (Abbexa, Cambridge, UK) (Enzyme-linked immunosorbent assay) temelji se na kompetitivnom enzimskom vezanju. U jažice su dodani standardi, uzorci i GABA specifično konjugirano protutijelo te inkubirani 45 minuta na 37°C . Jažice su potom isprane te je dodan Streptavidin-HRP (enzim peroksidaza hrena) te su ponovno inkubirane na 37°C , ali 30 minuta. Nakon inkubacije dodan je TMB supstrat (tetrametilbenzidin) koji je promijenio boju jažica u plavo. Plava boja se promijeni u žutu kod jažica u kojima je pristuna GABA dodatkom STOP otopine (reagens za zaustavljanje enzimske reakcije koji sadrži sumpornu kiselinu). Intenzitet žute boje je obrnuto proporcionalan koncentraciji GABA-e u svakoj pojedinoj jažici. Absorbancija je izmjerena spektrofotometrijski te je uz pomoć kalibracijske krivulje, izračunate pomoću različitih koncentracija standarda, dobivena koncentracija GABA-e pojedinačnog uzorka.

4.8.2. Glutamat ELISA

Koncentracije glutamata u L4/L5 razinama tkiva kralježnične moždine izračunate su pomoću ELISA metode (ELISA glutamate kit, Abnova, Taipei, Taiwan). U ekstrakcijske jažice dodani su standardi, uzorci i pufer za razrjeđivanje. Nakon 10 min vrtnje na orbitalnoj tresilici, uzeto je 25 µl i prebačeno na ploču za reakciju (Reaction plate). Potom su dodana 2 reagensa te Q-Buffer. Nakon dodavanja glutamatnog antiseruma, uzorci su inkubirani preko noći na 2-8°C. Idućeg dana dodan je enzimski konjugat. Nakon inkubacije od 30 min i ispiranja dodana je reakcijska otopina sa supstratom za enzimsku reakciju (tetrametilbenzidin i vodikov peroksid). Dodatkom STOP otopine, boja jažice se promijenila iz plave u žutu. Intenzitet boje obrnuto je bio proporcionalan koncentraciji glutamata u jažici. Absorbancija je izmjerena spektrofotometrijski te je iz nje dobivena koncentracija glutamata u uzorku.

4.9. STATISTIČKA ANALIZA

Bihevioralni rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna srednja greška i analizirani dvosmjernom analizom varijance za ponovljena mjerenja, nakon koje je slijedio Bonferonijev post hoc test. Podatci imunohistokemije i ELISA-e analizirani su u GraphPad programu, a od testova su korišteni jednosmjerna analiza varijance i Newman Keuls post hoc test. Statistička analiza semikvantitativnih skorova praznina u ventralnom rogu (Tablica 2) je napravljena pomoću jednosmjerne analize varijance neparametrijskih podataka (Kruskal Wallis test), nakon kojeg je slijedio Dunn-ov post hoc test. Razina značajnosti postavljena je na $p < 0.05$.

Tablica 2. Objašnjenje skoriranja praznina imunoreaktivnosti VAMP-2 u ventralnom rogu prereza L4/ L5 segmenta kralježnične moždine gdje je u obzir uzeta prisutnost praznina i njihov približan broj. Po grupi su pregledane 4 životinje, po svakoj po 3 prereza L4/L5 od strane dva neovisna pregledavača. Bodovi se kreću od 0 (nema praznina) do 3 (veće praznine s nejasno vidljivom granicom VAMP-2 aktivnosti).

SKOR	PRISUTNOST PRAZNINA	BROJ PRAZNINA
0	nema praznina	/
1	male s jasno vidljivom granicom VAMP-2 aktivnosti	<10
2	veće s nejasno vidljivom granicom VAMP-2 aktivnosti	<10
3	veće s nejasno vidljivom granicom VAMP-2 aktivnosti	>10

5. REZULTATI

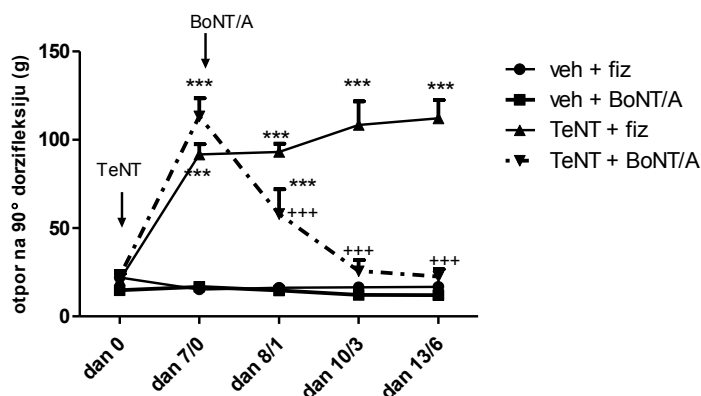
5.1. Mišićna hipertoniya izazvana TeNT-om

Injekcija TeNT u m. gastrocnemius je izazvala spastičnu parezu stražnjeg uda, koja se očituje kao ekstenzija stopala u odnosu na potkoljenu u budnih, svjesnih životinja. Pareza je bila limitirana na ipsilateralni zglob gležnja, dok je koljeni zglob zadržao normalnu pokretljivost. U bihevioralnim testovima paraliza stražnje noge se očitovala u unilateralno povišenom otporu na dorzifleksiju, povećanju potrebnog vremena prijelaza u testu prelaska preko uske šipke, te smanjenom vremenu održavanja na vrtećoj rota-rod šipki. Motorni deficiti nisu bili prisutni 1. dana nakon TeNT, a postali su očigledni 3 dana nakon davanja TeNT. U različitim bihevioralnim testovima maksimalni intenziteti deficita su bili prisutni u ponešto različitim vremenskim točkama: u rota-rod testu 3. dana nakon TeNT, kod prelaska uske šipke 7. dana nakon TeNT, a što se tiče otpora na dorzifleksiju, maksimalni intenzitet je bio vidljiv oko 10. dana nakon davanja TeNT. Treba spomenuti da se čini da oporavak u testovima rota rod i prelaska preko uske šipke nije bio posredovan povećavanjem funkcionalne uloge tretiranog uda, nego naučenom kompenzacijom i boljim održanjem ravnoteže pomoću preostalih neparaliziranih udovima u životinja tijekom trajanja pokusa. U odnosu na dozu 1.5 ng, niža doza TeNT od 1 ng je uzrokovala kratkotrajnije deficite koji su se popravljali ili više nisu bili prisutni 13. dana nakon davanja TeNT (rezultati nisu prikazani).

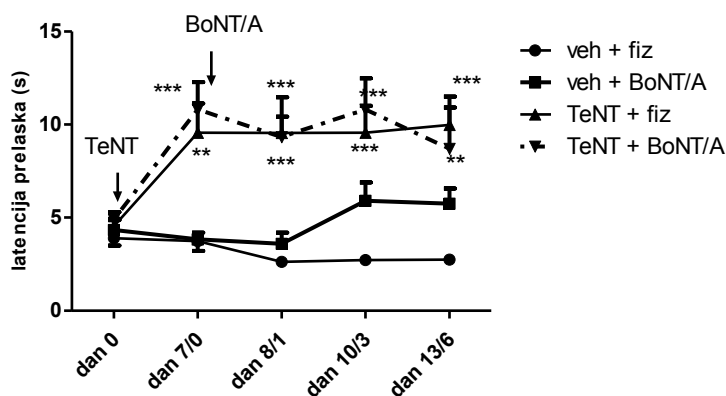
5.2. Intramuskularna injekcija BoNT/A smanjuje hipertoniya stražnjeg uda, ali ne poboljšava funkcionalne parametre testova ravnoteže i izdržljivosti

Intramuskularna injekcija BoNT/A od 5 U/kg u m. gastrocnemius je uzrokovala postupno sniženje mišićne hipertoniye i smanjenje otpora na fleksiju gležnja kod životinja s hipertonijom uzrokovanom TeNT. Nakon davanja BoNT/A kod životinja pretretiranih s TeNT i kontrolnih (vehikulum + BoNT/A) životinja vidljiv je i lokalni mlohavi paralitički učinak. Taj se učinak očitovao kao pogoršani refleks širenja nožnih prstiju ($DAS = 4 \pm 0$), prema skali razvijenoj za miševe i štakore. Učinak BoNT/A je bio vidljiv već 1. dana, a dosegno je maksimalni učinak 3. dana nakon intramuskularnog davanja. U testovima hoda po šipki i rota-rod testu, tretman BoNT/A nije poboljšao latenciju prelaska preko šipke i održavanja na rota-rod uređaju (Slika 1).

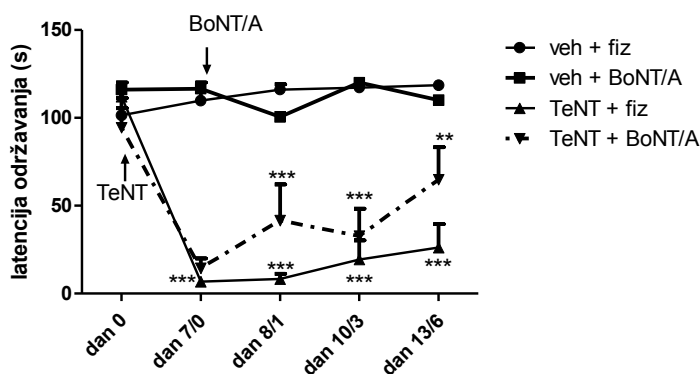
A.



B.



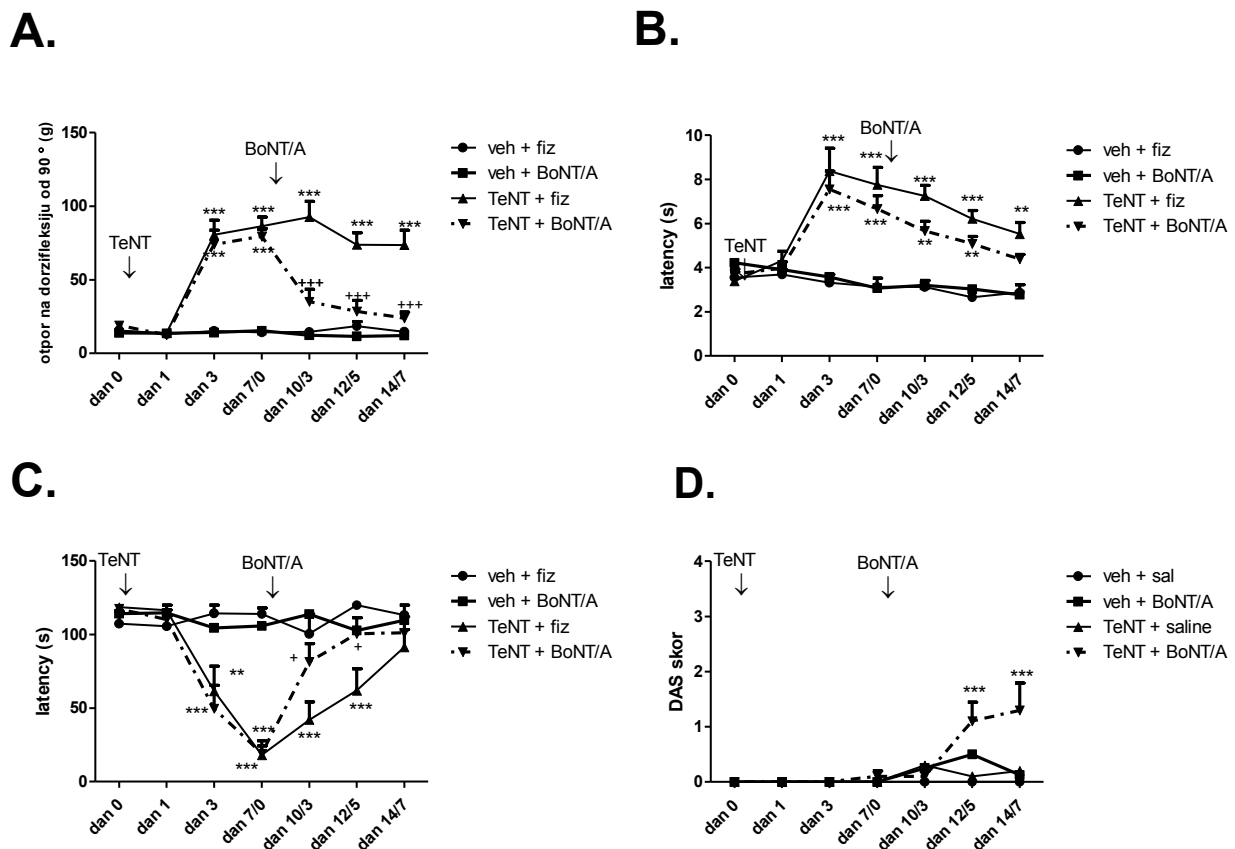
C.



Slika 1. BoNT/A (5U/kg) primijenjen u m. gastrocnemiusu prethodno tretiran TeNT (1.5 ng) smanjuje mišićnu hipertenziju uzrokovanu TeNT, ali ne mijenja funkcionalne parametre u testovima koordinacije i izdržljivosti. Mišićna hipertenzija je ispitana pomoću otpora na dorzifleksiju gležnja (**A.**). Koordinacija je ispitana u testu hoda po uskoj šipki (**B.**), a izdržljivost pomoću rota-rod testa (**C.**). Legenda: veh: tretman vehikulumom; fiz: tretman fiziološkom otopinom; Strelice označavaju vremena primjene TeNT i BoNT/A, a oznake na apscisi označavaju dan nakon primjene TeNT/dan nakon primjene BoNT/A. Aritmetička sredina ± srednja standardna greška; ***- $p < 0.001$ u usporedbi s grupom veh + fiz; +++- $p < 0.001$ u usporedbi s grupom TeNT + fiz (dvosmjerna analiza varijance za ponovljena mjerenja i Bonferronijev post hoc test).

5.3. Injekcija BoNT/A u ishijadični živac smanjuje hipertoniju i funkcionalnu upotrebljivost noge u rota-rod testu

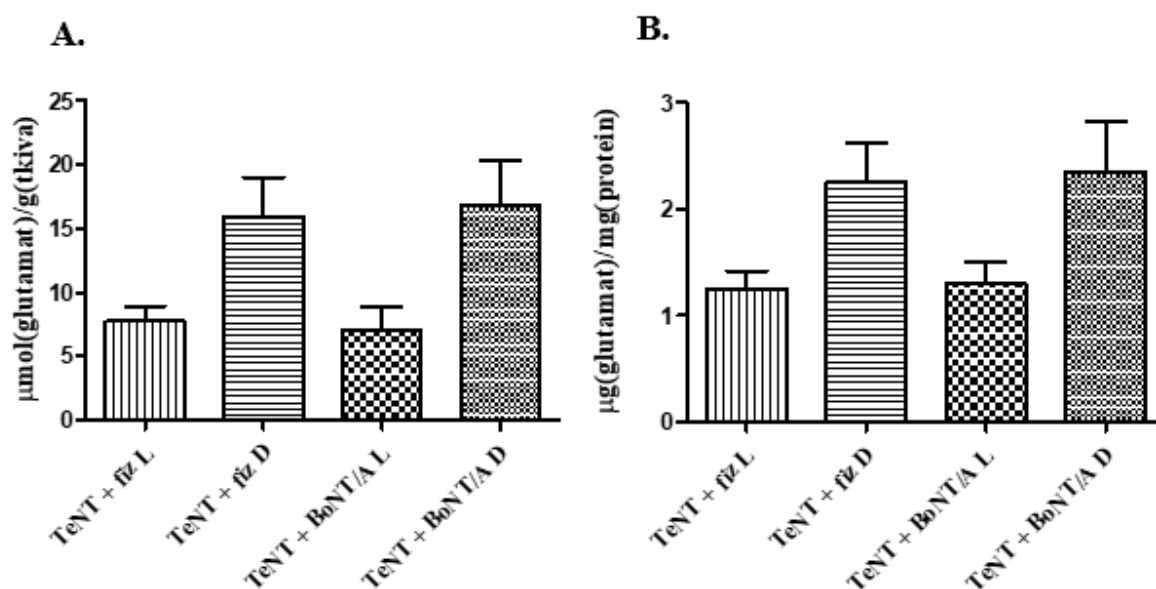
BoNT/A injekcija u živac je uzrokovala smanjenje otpora na fleksiju gležnja slične magnitude kao i BoNT/A intramuskularna injekcija. Učinak je bio vidljiv 3. dana nakon davanja BoNT/A i ostao sličan 5. i 7. dana nakon BoNT/A. Zanimljivo je da je BoNT/A kod spastičnih životinja poboljšao i latenciju održavanja na rota-rod šipki. Nakon 7 dana učinak BoNT/A nije bio statistički značajan jer se rota-rod učinak počeo poboljšavati kod svih životinja. DAS je bio blago, ali značajno poremećen kod životinja gdje je kombiniran tretman TeNT i BoNT/A.



Slika 2. BoNT/A (5U/kg) primijenjen intraneuralno u n. ischiadicus smanjuje mišićnu hipertoniju, uzrokovanu injekcijom TeNT (1.5 ng) u m. gastrocnemius, te poboljšava performanse u rota-rod testu. Mišićna hipertonija je ispitana pomoću otpora na dorzifleksiju gležnja (A.). Koordinacija je ispitana u testu hoda po uskoj šipki (B.), izdržljivost pomoću rota-rod testa (C.), a lokalna flacidna paraliza pomoću DAS (D.) Legenda: veh: tretman vehikulumom; fiz: tretman fiziološkom otopinom; Strelice označavaju vremena primjene TeNT i BoNT/A, a oznake na apscisi označavaju dan nakon primjene TeNT/dan nakon primjene BoNT/A. Aritmetička sredina ± srednja standardna greška; ***- $p < 0.001$ u usporedbi s grupom veh + fiz; + $p < 0.05$; +++- $p < 0.001$ u usporedbi s grupom TeNT + fiz. (dvosmjerna analiza varijance za ponovljena mjerenja i Bonferronijev post hoc test).

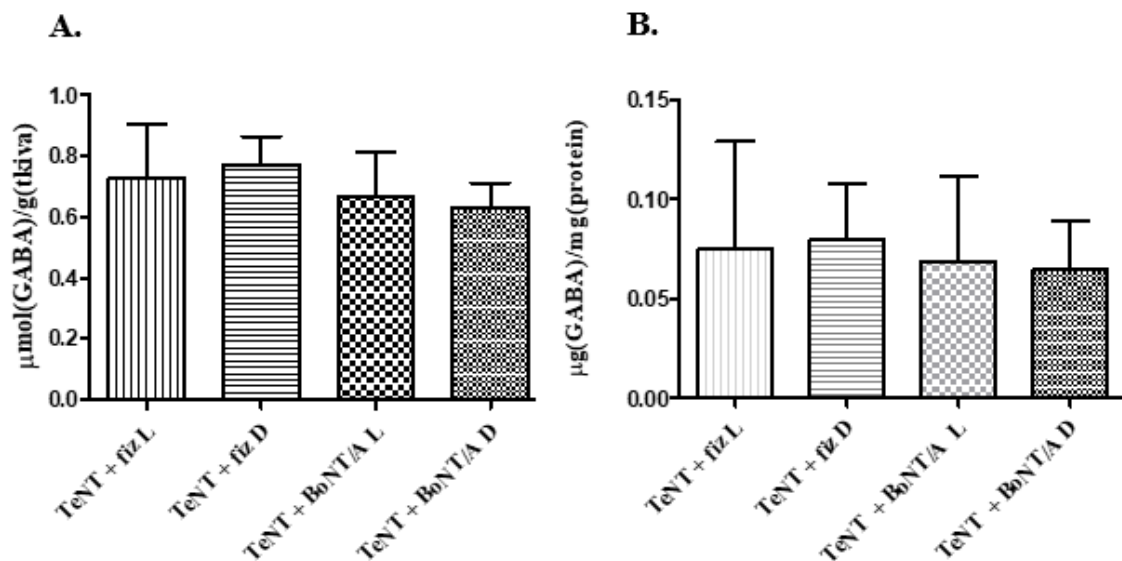
5.4. TeNT povisuje koncentraciju glutamata u ipsilateralnom ventralnom rogu, dok se koncentracija GABA-e značajno ne mijenja

Mjereći koncentracije centralnog neurotransmitera glutamata u razini lumbalnih kralježaka L4/L5 životinja tretiranih s 1.5 ng TeNT u m. gastrocnemius, opažen je trend povećanja koncentracije glutamata u desnom ventralnom rogu (ipsilateralno tretmanu TeNT) u odnosu na kontralateralnu stranu, međutim jednosmjerna analiza varijance i post hoc analiza nisu pokazali značajne razlike između eksperimentalnih grupa. Tretman s BoNT/A u n. ischiadicus 7. dana nakon TeNT nije utjecao na povišenje koncentracije glutamata u ipsilateralnom rogu uzrokovanu s TeNT (Slika 3).

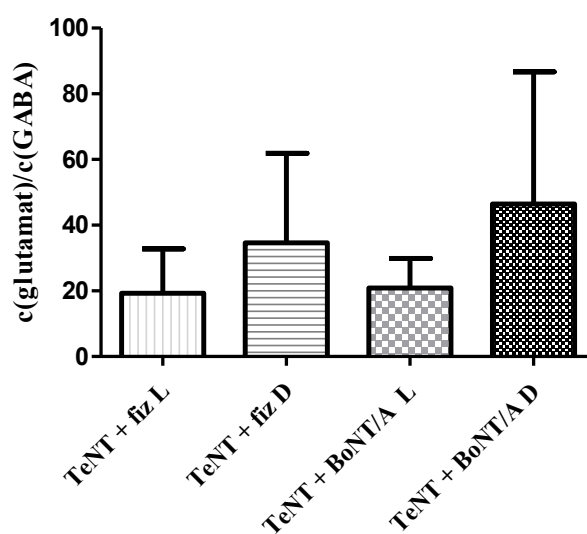


Slika 3. Učinak tretmana TeNT (1.5 ng, im. u m. gastrocnemius) i BoNT/A (5 U/kg; in. u n. ischiadicus) na koncentraciju glutamata u desnom (D; ipsilateralno tretmanu neurotoksinima) i lijevom (L; kontralateralno tretmanu neurotoksinima) ventralnom rogu. Nema vidljive razlike u koncentraciji glutamata gledano po g tkiva (A.) ni po g proteina (B.) ventralnog roga segmenta L4/L5 kralježnične moždine. Aritmetička sredina ± srednja standardna greška.

Kod mjerenja koncentracije centralnog neurotransmitera GABA-e u razini lumbalnih kralježaka L4/L5 životinja tretiranih s TeNT nije vidljiva značajna razlika tretirane, ipsilateralne strane, u odnosu na netretiranu, kontralateralnu stranu, niti je BoNT/A utjecao na količinu GABA-e (Slika 4).



Slika 4. TeNT (im.) i BoNT/A (in.) ne mijenjaju tkivnu koncentraciju inhibitornog neurotransmitora GABA-e u desnom (D; ipsilateralno tretmanu s neurotoksinima) i lijevom (L; kontralateralno tretmanu neurotoksinima) ventralnom rogu. Nema vidljive razlike u koncentraciji GABA-e gledano po g tkiva (A.) ni po g proteina (B.) ventralnog roga segmenta L4/L5 kralježnične moždine. Aritmetička sredina ± srednja standardna greška

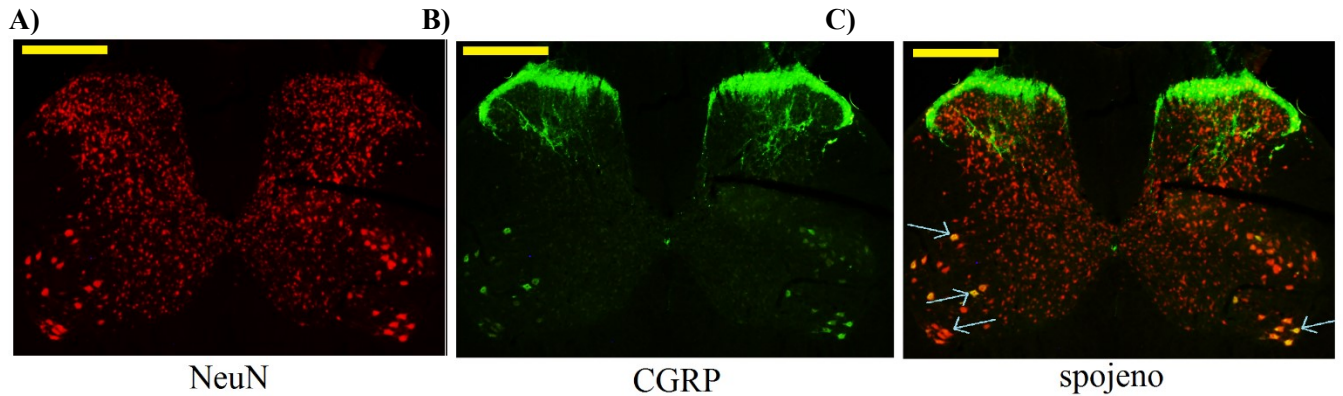


Slika 5. TeNT (im.) i BoNT/A (in.) ne mijenjaju omjer koncentracija glutamata i GABA-e u desnom (D; ipsilateralno tretmanu s neurotoksinima) i lijevom (L; kontralateralno tretmanu neurotoksinima) ventralnom rogu. Aritmetička sredina ± srednja standardna greška.

5.5. TeNT i BoNT/A ne mijenjaju broj motoneurona u ventralnom rogu

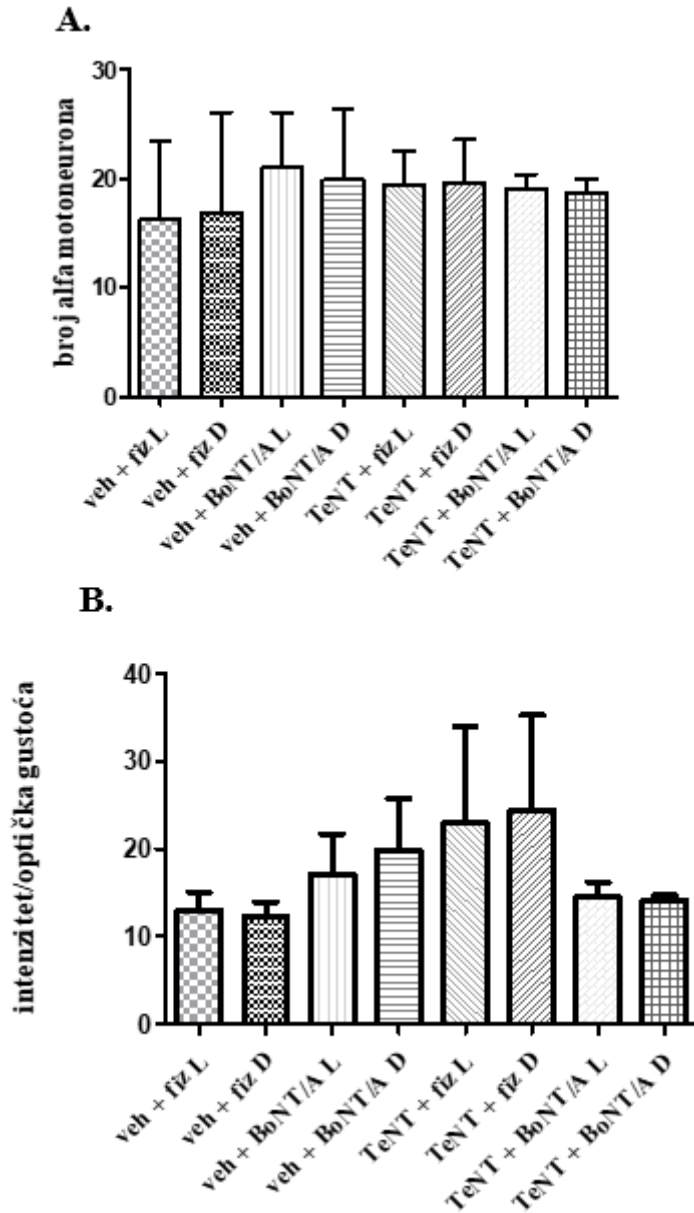
Kako bismo utvrdili mogući neurotoksični učinak TeNT i kombinacije s BoNT/A tretmanom, učinjeno je imunohistokemijsko bojenje i analiza intenziteta molekula CGRP (Calcitonin Gene-Related Peptide)

i NeuN (Neuronal Nuclear Antigen) u segmentima L4/L5 kralježnične moždine (Slika 6). Analizom intenziteta ipsilateralno i kontralateralno pokazalo se da nema statističke značajnosti u razlici obaju intenziteta.



Slika 6. Mikrofotografija reprezentativnog prereza L4 segmenta kralježnične moždine. Stupac mjerila = 500 μ m.
A. Crvenim fluorescentnim obojanjem prikazana je molekula NeuN, markera distinkcije tijela alfa motoneurona.
B. Zeleno fluorescentno obojanje prikazuje molekulu CGRP, još jedan marker distinkcije tijela alfa motoneurona.
C. Prikaz spojenih slika NeuN i CGRP sa označenim tijelima alfa motoneurona. Strelice = tijela alfa motoneurona.

Analizom razlike u broju prikazanih alfa motoneurona ipsilateralno i kontralateralno pokazalo se kako ne postoji statistička značajnost u broju alfa motoneurona prije tretmana i nakon tretmana TeNT+fiz, veh+BoNT/A i TeNT+BoNT/A (** - $p \gg 0.05$, jednosmjerna analiza varijance).

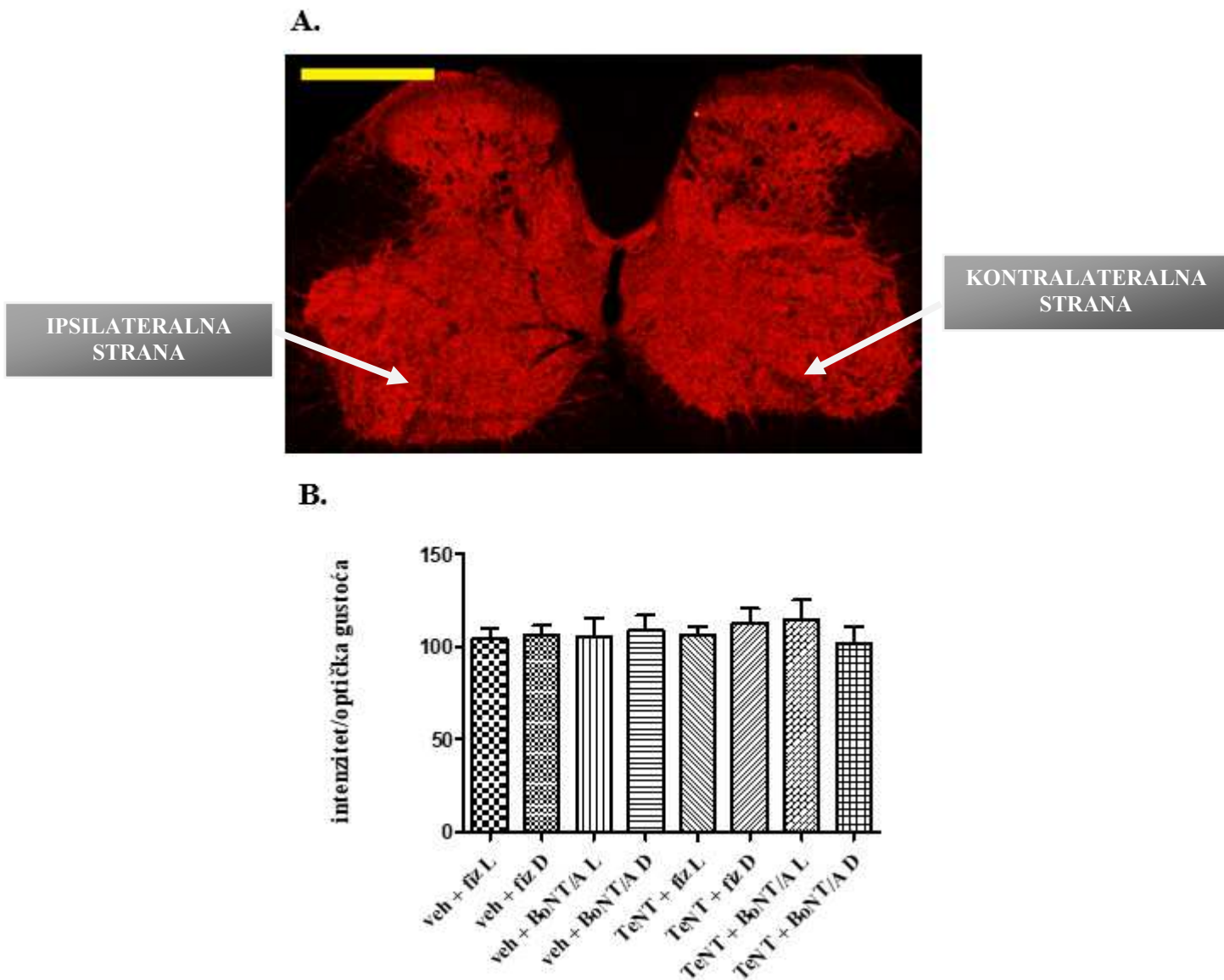


Slika 7. A. TeNT (1.5 ng, im.) i BoNT/A (5U/kg in.) ne mijenjaju broj alfa motoneurona u ventralnim rogovima ipsilateralno (D) i kontralateralno (L) tretmanu neurotoksinima. Broj motoneurona je analiziran ručno. Aritmetička sredina \pm srednja standardna greška. **B.** TeNT (im.) i BoNT/A (in.) ne mijenjaju intenzitet molekule CGRP u ispitivanim skupinama (** - $p > 0.05$, jednosmjerna analiza varijance).

Legenda: veh: tretman vehikulomom; fiz: tretman fiziološkom otopinom. (N(br. presjeka po životinji) =3; N(br. životinja po grupi)=4)

5.6. Razina SV2C, staničnog akceptora BoNT/A, nije bila promijenjena s intramuskularno primjenjenim TeNT i BoNT/A

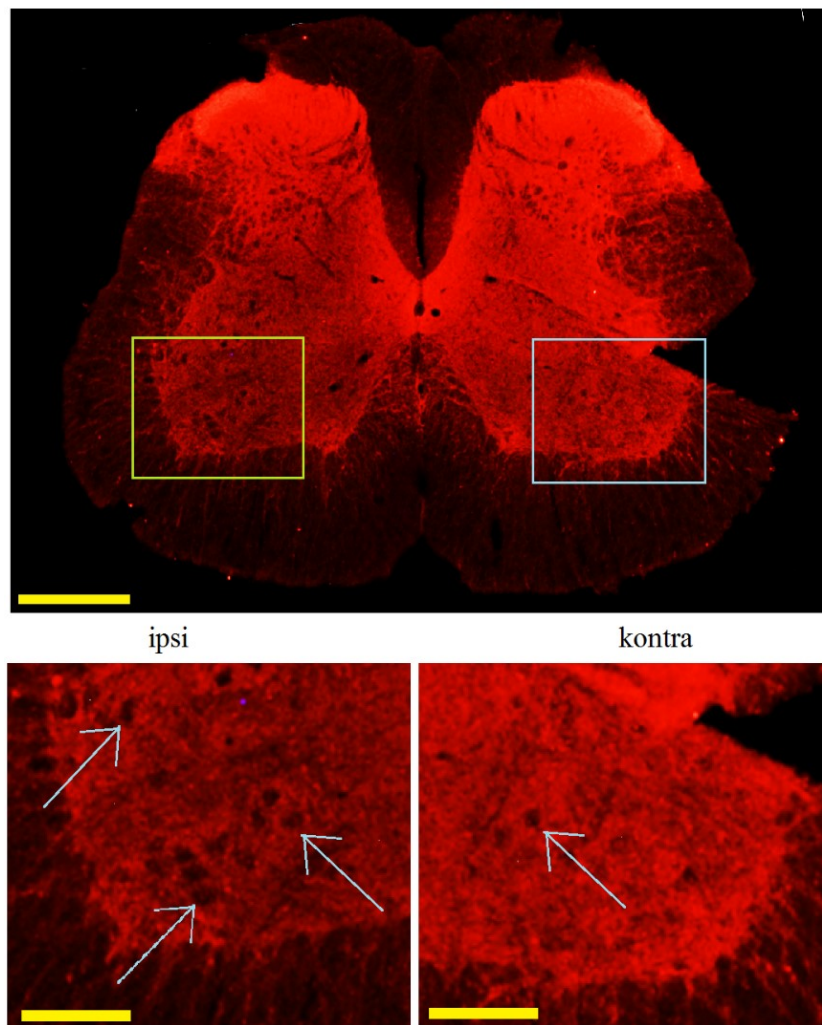
SV2-C imunohistokemijskom analizom intenziteta fluorescencije u ipsilateralnom i kontralateralnom rogu kralježnične moždine na razini L4/L5, nije pokazana značajna razlika ni između tretiranih grupa ni usporedbom ipsilateralne u odnosu na kontralateralnu stranu.



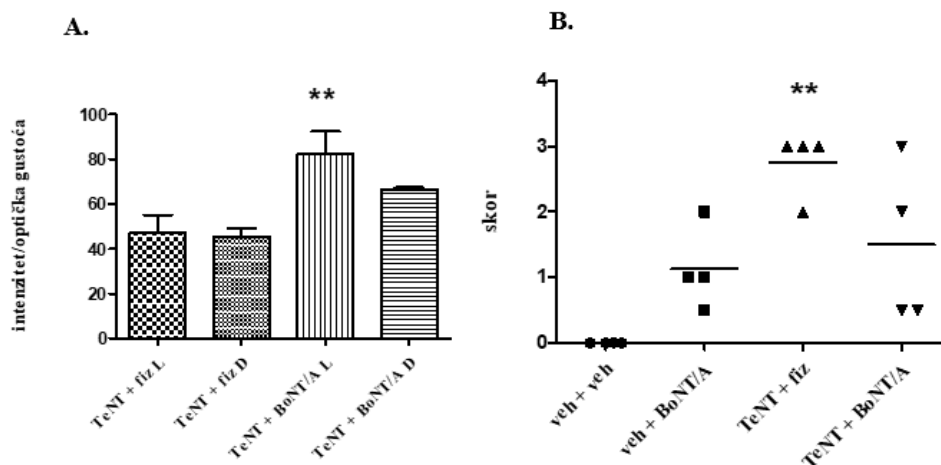
Slika 8. A. Mikrofotografija reprezentativnog prereza L4 segmenta kralježnične moždine tretiranog TeNT+fiz. Crveno obojenje prereza predstavlja prisutnost SV2C molekule. Stupac mjerila = 500 μ m. (N(br. presjeka po životinji) =3; N(br. životinja po grupi)=4) **B.** TeNT (1.5 ng, im.) i BoNT/A (5 U/kg, in.) u m. gastrocnemius ne mijenjaju količinu SV2C u L4/L5 segmentima kralježnične moždine. (**- $p >> 0.05$, jednosmjerna analiza varijance). Legenda: veh: tretman vehikulumom; fiz: tretman fiziološkom otopinom.

5.7. TeNT i BoNT/A enzimatski djeluju na svoje sinaptičke mete u ventralnom rogu

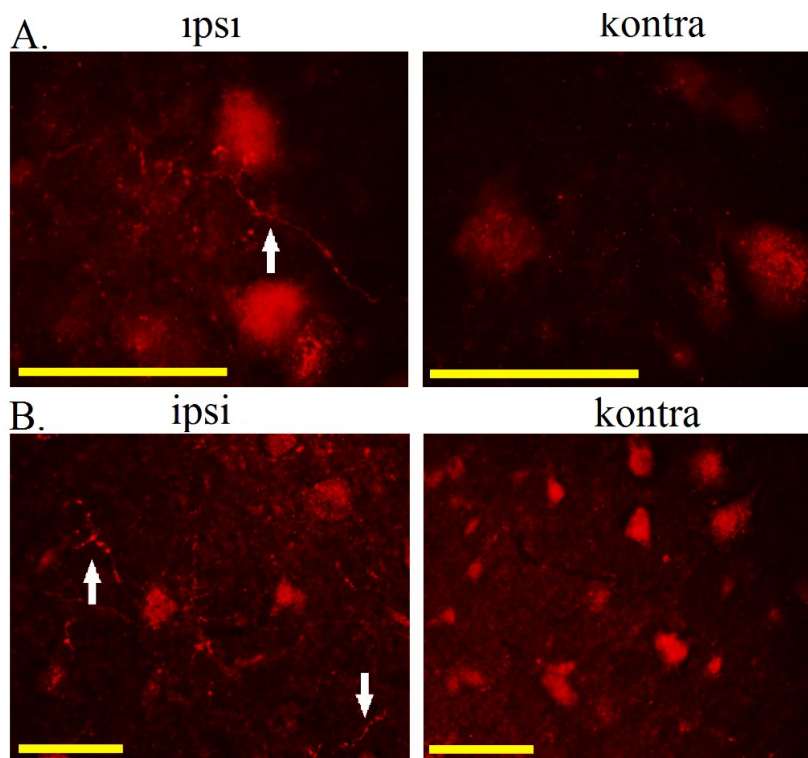
VAMP-2 imunohistokemijskom analizom nije dobivena značajna razlika u intenzitetu između grupe tretirane sa TeNT + BoNT/A i netretirane, ali je razlika uočena u životinja tretiranih samo s BoNT/A. Uz to, na presjecima su vidljiva područja smanjene imunohistokemijske reaktivnosti, tj. smanjenje količine VAMP-2. Područja okružuju tijela alfa motoneurona u području L4/L5 segmenta kralježnične moždine. Napravljena je analiza temeljena na ručnom brojanju područja smanjene imunoreaktivnosti, koja je pokazala značajnu razliku u grupe tretirane TeNT + fiziološka otopina.



Slika 9. Mikrofotografija reprezentativnog prereza L4 segmenta kralježnične moždine. Strelice prikazuju lokacije praznina u ipsilateralnom ventralnom rogu životinje tretirane s TeNT i fiziološkom otopinom. Stupac mjerila = 500 μ m. (N(br. presjeka po životinji) =3; N(br. životinja po grupi)=4)



Slika 10. A. TeNT (1.5 ng, im.) i BoNT/A (5 U/kg, in.) značajno utječu na ekspresiju VAMP-2 u kontralateralnom ventralnom rogu L4/L5 segmenta kralježnične moždine. (**- $p < 0.01$ u odnosu na TeNT + fiz D, jednosmjerna analiza varijance uz Newman-Keuls post hoc). **B.** TeNT (1.5 ng) uzrokuje pojavu praznina u unutrašnjosti ipsilateralnog ventralnog roga. Skoriranje praznina u ventralnom rogu ipsilateralnom tretmanu s TeNT i BoNT/A na temelju semikvantitativne analize opisane u tablici 2. Legenda: veh: tretman vehikulomom; fiz: tretman fiziološkom otopinom. Rezultati su prikazani kao pojedinačne vrijednosti, a horizontalna linija predstavlja medijan (**- $p < 0.01$ u usporedbi s eksperimentalnom grupom veh+veh, Kruskal Wallis-ova analiza varijance neparametrijskih podataka i Dunnov post-hoc test).



Slika 11. Enzimsku aktivnost BoNT/A nakon intraneuralne (A) i intramuskularne primjene BoNT/A u dozi 5U/kg (B). Strelica označava vlakno pocijepanog SNAP-25. Stupci mjerila prikazuju 100 μm .

6. RASPRAVA

Botulinum toksin tip A je registriran kao lijek za simptomatsko liječenje već spomenutih hiperkinetskih poremećaja pokreta. Široko pretpostavljen mehanizam djelovanja se temelji na sprječavanju spajanja vezikula acetilkolina i membrane neurona u području neuromuskularne sinapse, nakon cijepanja SNAP-25 proteina (Blasi i sur., 1993). Posljedično je inhibirana egzocitoza acetilkolina što dovodi do mišićne paralize (de Paiva, 1999). Međutim, taj predloženi mehanizam ne može objasniti sve korisne učinke BoNT/A kod liječenja, koji ne moraju nužno pratiti tijek paralize. Specifično, opaženo je da korisni učinci BoNT/A kod određenih hiperkinetskih poremećaja, poput cervikalne distonije, uzrokuju funkcionalno poboljšanje hipertoničnosti, bez neželjenih posljedica flacidne paralize (Rosales i Dressler, 2010).

Dosad su učinci BoNT/A ispitivani u normalnim mišićima zdravih životinja, što ne odgovara kliničkoj primjeni u hiperaktivne mišiće. Stoga je u ovom istraživanju po prvi puta korišten štakorski model fokalne mišićne hipertoničnosti u istraživanju djelovanja BoNT/A. Za postizanje lokalnog mišićnog spazma sličnog onome u hiperkinetskim poremećajima pokreta, spazam je izazvan niskom dozom TeNT u m.gastrocnemius. U bihevioralnim testovima se spastična paraliza očitovala u unilateralno povišenom otporu na dorzifleksiju, povećanju vremena potrebnog za prijelaz u testu prelaska preko uske šipke, te smanjenom vremenu održavanja na vrtećoj rota-rod šipki (Slika 1 i 2).

Nakon intramuskularnog iniciranja BoNT/A u štakore tretirane tetanus toksinom došlo je do smanjenja hipertoničnosti stražnjeg uda, ali ne i do poboljšanja rezultata funkcionalnih testova (Slika 1). Takav učinak se može objasniti prevladavajućim djelovanjem BoNT/A na razini neuromišićne veze. Manjak korisnog učinka kod rota-rod i testa hoda po uskoj šipki nakon intramuskularne primjene BoNT/A bi mogao biti uzrokovan dodatnim deficitom kojeg izaziva flacidna paraliza kada se BoNT/A injicira u mišić. Flacidna paraliza se kod ovih životinja očitovala deficitom refleksa širenja prstiju (DAS skor oko 4, što znači da se prsti nisu širili). S druge strane, nakon injiciranja BoNT/A u ishijadični živac štakori su također pokazali smanjenje otpora na fleksiju, ali i poboljšanje vremena održavanja na vrtećoj šipki u funkcionalnom rota-rod testu. Štoviše, kod štakora nije opažena pojava značajnije flacidne paralize koja bi se očitovala većim poremećajem DAS skora. Stoga se čini da hipotetsko djelovanje BoNT/A na razini neuromišićne spojnice nakon injiciranja BoNT/A u živac ne može objasniti korisne učinke koje smo ovdje opazili. Navedeni učinci ukazuju na lokalno djelovanje BoNT/A nakon mišićne primjene, ali ne isključuju niti mogućnost antispastičkog učinka na centralni živčani sustav nakon intraneuronalne primjene. Stoga je pretpostavljeno da bi ti učinci mogli biti i rezultat retrogradnog transporta BoNT/A u ventralni rog, s posljedičnim djelovanjem na disbalans inhibitorne i ekscitatorne neurotransmisije na razini ventralnog roga.

Mogući učinak BoNT/A na središnji disbalans između ekscitacijske i inhibicijske neurotransmisije smo ispitivali mjerenjem koncentracije glutamata i GABA-e u ventralnom rogu životinja injiciranih s TeNT. Mjerenjem koncentracije glutamata u ventralnom rogu opažen je porast koncentracije na strani tretiranoj TeNT (Slika 3). U istih životinja izmjerena je i koncentracija GABA-e, neurotransmitera kojemu tetanus toksin inhibira egzocitozu (Brooks i sur., 1957), koja se nije značajno promijenila (Slika 4). Porast koncentracije glutamata u ipsilateralnom ventralnom rogu sugerira da djelovanje TeNT može dovesti do pojačane sinteze, pohrane ili lučenja glutamata u ventralnom rogu, što bi mogla biti indirektna posljedica smanjenja inhibitorne transmisije. S druge strane količina GABA-e u ventralnom rogu se značajno ne mijenja iako bi primarno očekivano mjesto djelovanja TeNT trebala biti inhibicijska neurotransmisija. Uzrok izostanka promjene koncentracije GABA-e bi mogao biti kompenziranje učinka povećane pohrane GABA-e u interneuronima, a s druge strane smanjenja količine izlučene GABA-e. U ovim pokusima bilo bi prikladnije pratiti količinu otpuštenih neurotransmitera u izvanstaničnoj tekućini metodom mikrodijalize, međutim, takve postupke nismo bili u mogućnosti tehnički izvesti. Na porast koncentracije glutamata uzrokovanim TeNT u ipsilateralnom ventralnom rogu BoNT/A nije djelovao. Čini se da mehanizam djelovanja BoNT/A na smanjenje spastične paralize nakon intraneuronalne primjene ne uključuje smanjenje ekspresije glutamata u tkivu ventalnog roga (Slika 3).

Prikazom molekula CGRP, produkta alfa motoneurona, i NeuN, antigena jezgre alfa motoneurona, željeli smo vidjeti utječu li toksini na broj neurona i tako ispitati mogućnost njihova neurotoksičnog učinka (Slika 6). Ručnim brojanjem i usporedbom obojanih presjeka ustvrdili smo kako ne postoji razlika u broju alfa motoneurona. Računalnom analizom intenziteta također nije zabilježena značajna razlika ekspresije CGRP-a i NeuN (Slika 7). Iz navedenog se može zaključiti kako BoNT/A i TeNT nemaju utjecaj na broj alfa motoneurona ventalnog roga kralježnične moždine. Također, možemo zaključiti da TeNT i BoNT/A nemaju pojedinačno, ali ni zajedničko neurotoksično djelovanje na razini ventalnog roga, što bi moglo predstavljati prednost ovakvog modela istraživanja u odnosu na druge modele istraživanja spasticiteta na razini leđne moždine (ekscitotoksičnost, mehaničke ozljede itd.).

Na razini ventalnog roga kralježnične moždine tetanus toksin prilikom retrogradnog transporta s periferije (Blencowe i sur., 2010) veže se i cijepa VAMP-2, svoj ciljni protein, potreban za otpuštanje neurotransmitera iz sinaptičkih završetaka (Schiavo, 2000). Imunohistokemijskom analizom pokazano je da tetanus toksin smanjuje količinu VAMP-2 proteina u području alfa motoneurona, ali ne mijenja njegovu ukupnu količinu. Područja ograničene smanjene imunoreaktivnosti VAMP-2 samo oko tijela alfa motoneurona mogu ukazivati da TeNT enzimski najviše cijepa VAMP samo u neposrednoj blizini tijela motoneurona, dok se smanjenje u udaljenijim sinapsama ne može vidjeti kao smanjenje ukupnog intenziteta VAMP-2 jer je frakcija pocijepanog VAMP-2 u udaljenijim sinapsama mala (Slika 9 i 10).

Glavno mjesto djelovanja BoNT/A je sinaptički protein SNAP-25, čijim cijepanjem priječi egzocitozu acetilkolina u perifernu neuromuskularnu sinapsu vodeći u paralizu (Blasi i sur., 1993). Imunohistokemijskim bojanjem presjeka kralježnične moždine životinja tretiranih TeNT + BoNT/A in. i im. prikazali smo prisutnost pocijepanog SNAP-25 (Slika 11). Ovaj nalaz ukazuje na moguće centralno djelovanje BoNT/A nakon perifernog inciranja niske doze toksina u mišić, odnosno živac. Zanimljivo, uočeno je i povišenje intenziteta VAMP-2 prilikom iniciranja BoNT/A u spastični mišić prethodno tretiran s TeNT (Slika 10 A.). Zanimljivo je da do povećanja intenziteta dolazi na strani kontralateralnoj perifernom injiciranju toksina. Mehanizam toga nije razjašnjen i zahtjeva daljnje provjere.

Botulinum i tetanus toksin dijele slično receptorsko mjesto na periferiji, potrebno za ulazak u neuromuskularnu spojnicu, a to su gangliozidi, sastavne molekule membrane kolinergičkih neurona (Winter i sur., 1996) (Schengrund i sur., 1991). Za ulazak BoNT/A u perifernu mišićnu sinapsu, kao i centralnu, osim gangliozida, ključan je i SV2C protein (Benoit i sur., 2014). Analizom obojanih presjeka kralježnične moždine pokazano je kako nema značajnije promjene intenziteta ni u jednoj grupi životinja (Slika 8 B.). Ovaj nalaz bi mogao upućivati na to da povećanje ekspresije SV2C, proteina koji posreduje ulazak BoNT/A u stanicu ne može objasniti donekle selektivno delovanje BoNT/A na hipertonične mišiće u pojedinim poremećajima pokreta poput distonije. Međutim, manjak vidljive promjene SV2C proteina bi mogao biti zamaskiran velikom količinom SV2C u sinapsama i neuronima koji nisu direktno zahvaćeni s TeNT i BoNT/A u našem pokusu.

7. ZAKLJUČCI

U ovom istraživanju smo prvi ispitali djelovanje BoNT/A u spastičnim mišićima eksperimentalnih životinja, pri čemu smo koristili mišićnu injekciju TeNT u m. gastrocnemius kao način izazivanja fokalne spastične paralize u štakora. Promatranjem učinka nakon injiciranja BoNT/A in. i im. vidljivo je smanjenje hipertoničnosti mišića. Pritom, korisni učinak BoNT/A nakon intraneuronalne primjene ne možemo objasniti klasičnim pretpostavljenim mehanizmom djelovanja na razini neuromišićne spojnice. Mjerenjem ukupne koncentracije GABA-e i glutamata u tkivu ventralnog roga nismo bili u mogućnosti utvrditi moguće djelovanje BoNT/A na disbalans inhibicijske i ekscitacijske transmisije. U ventralnom rogu smo detektirali pocijepani SNAP-25 nakon primjene BoNT/A i nakon mišićne i nakon neuronalne primjene, što ukazuje na njegovo moguće centralno djelovanje. Međutim, objašnjenje antispastičkog djelovanja BoNT/A u središnjem živčanom sustavu zahtijeva daljnja istraživanja.

8. ZAHVALE

Zahvaljujem svojem mentoru dr.sc.Ivici Mataku na pruženoj prilici, upoznavanju sa različitim aspektima laboratorijskog rada, velikodušnoj pomoći, usmjeravanju i savjetovanju.

Također zahvaljujem Božici i Josipu, med.lab.teh. za pomoć u snalaženju u laboratoriju i pri izvođenju pokusa.

Zahvalio bih se i svojim roditeljima i sestri na pruženoj potpori.

Za kraj, zahvalio bih se udruzi CroMSIC na pruženim nezaboravnim trenutcima.

9. POPIS LITERATURE

Alimuddin Z. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. The Lancet Infectious Diseases 2010;10(5):303-304

Antonucci F., Rossi C., Gianfranceschi L., Rossetto O., Caleo M. Long distance retrograde effects of botulinum neurotoxin A. J Neurosci 2008;28:3689-3696

Benoit RM. i sur. Structural basis for recognition of synaptic vesicle protein 2C by botulinum neurotoxin A. Nature 2014;505(7481):108-111

Blasi J., Chapman ER., Link E., Binz T., Yamasaki S., Camili PD., Südhof TC., Niemann H., Jahn R. Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. Nature 1993;365(6442):160-163

Blencowe H., Lawn J., Vandelaer J., Roper M., Cousens S. Tetanus toxoid immunization to reduce mortality from neonatal tetanus. International Journal of Epidemiology 2010;102-109

Brinar V. Neurologija za medicinare, 1.izdanje. Zagreb: Medicinska naklada 2009; str.272-302

Broide RS., Rubino J., Nicholson GS., Ardila MC., Brown MS., Aoki KR., Francis J. The rat Digit Abduction Score (DAS) assay: a physiological model for assessing botulinum neurotoxin-induced skeletal muscle paralysis. Toxicon 2013;71:18-24

Brooks VB., Curtis DR., Eccles JC. The action of tetanus toxin on the inhibition of motoneurons. The Journal of physiology 1957;135(3):655-672

Caleo M., Antonucci F., Restani L., Mazzocchio R. A reappraisal of the central effects of botulinum neurotoxin type A: By what mechanism?. Journal of Neurochemistry 2009;109(1):15-24

Cui M., Khanijou S., Rubino J., Aoki KR. Subcutaneous administration of botulinum toxin A reduces formalin-induced pain. Pain 2014;107:125-133

Davie CA. A review of Parkinson's disease. British Medical Bulletin 2008;86(1):109-127

de Paiva A., Meunier FA., Molgo J., Aoki KR., Dolly JO. Functional repair of motor endplates after botulinum neurotoxin type A poisoning: Biphasic switch of synaptic activity between nerve sprouts and their parent terminals. Proceedings of the National Academy of Sciences 1999;96(6):3200-3205

- Defebvre L., Krystkowiak P. Movement disorders and stroke. *Revue Neurologique* 2006;172(8-9):483-487
- Dressler D., Saberi FA. Botulinum toxin: Mechanisms of action. *European Neurology* 2005;53(1):3-9
- Filippi GM., Errico P., Santarelli R., Bagolini B., Manni E. Botulinum A toxin effects on rat jaw muscle spindles. *Acta otolaryngologica* 1993;113(3):400–404
- Fried GW., Fried KM. Spinal cord injury and use of botulinum toxin in reducing spasticity. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America* 2003;14(4):901-910
- Hallett M. Neurophysiology of dystonia: The role of inhibition. *Neurobiol Dis* 2011;42(2):177-84
- Hassel B. Tetanus: Pathophysiology, treatment, and the possibility of using botulinum toxin against tetanus-induced rigidity and spasms. *Toxins* 2013;5(1):73-83
- Jianjun L., Shurong J., Weihong W., Yan Z., Fanyong Z., Nanling L. Botulinum toxin-A with and without rehabilitation for the treatment of spastic cerebral palsy. *The Journal of international medical research* 2013;41:636-641
- Katzung B.G., Masters S.B., Trevor A.J. *Basic and clinical pharmacology*, 12th edition. New York: McGraw-Hill 2012; str.115-482
- LeDoux M. *Animal Models of Movement Disorders*, 1st edition. Elsevier Academic Press 2005
- Matak I., Bach-Rojecky L., Filipović B., Lacković Z. Behavioral and immunohistochemical evidence for central antinociceptive activity of botulinum toxin A. *Neuroscience* 2011;186:201-207
- Matak I., Riederer P., Lacković Z. Botulinum toxin's axonal transport from periphery to the spinal cord. *Neurochem Int* 2012;61:236-239
- Matthews CC., Fishman PS., Wittenberg GF. Tetanus toxin reduces local and descending regulation of the H-reflex. *Muscle Nerve* 2014;49(4):495-501
- Münchau A., Bhatia KP. Uses of botulinum toxin injection in medicine today. *BMJ (Clinical research ed.)* 2000;320(7228):161–165.
- Nigam PK., Nigam A. Botulinum toxin. *Indian J Dermatol* 2010;55(1):8–14
- Pfeiffer RF. Wilson's disease. *Seminars in Neurology* 2007;27(2):123-132
- Rosales RL., Dressler D. On muscle spindles, dystonia and botulinum toxin. *Eur J Neurol* 2010;17(1):71-80
- Santamato A., Micello MF., Ranieri M., Valeno G., Albano A., Baricich A., Cisari C., Intiso D., Pilotto A., Logroscino G., Panza F. Employment of higher doses of botulinum toxin type A to reduce spasticity after stroke. *Journal of the Neurological Sciences* 2015;350(1-2):1-6
- Schengrund CL., DasGupta BR., Ringler NJ. Binding of Botulinum and Tetanus Neurotoxins to Ganglioside GT1b and Derivatives Thereof. *Journal of Neurochemistry* 1991;57(3):1024–1032
- Schiavo G., Matteoli M., Montecucco C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiological reviews* 2000;80(2):717–766

Schwab ME., Thoenen H. Electron microscopic evidence for a transsynaptic migration of tetanus toxin in spinal cord motoneurons: An autoradiographic and morphometric study. *Brain Research* 1976;105(2):213–227

Teasell R., Foley N., Pereira S., Sequeira K., Miller T. Evidence to Practice: Botulinum Toxin in the Treatment of Spasticity Post Stroke. *Topics in Stroke Rehabilitation* 2012;19(2):115–121

Walter BL., Vitek JL. Pathophysiology of hyperkinetic movement disorders. *Hyperkinetic Movement Disorders* 2012;1–22

Winter A., Ulrich WP., Wetterich F., Weller U., Galla HJ. Gangliosides in phospholipid bilayer membranes: Interaction with tetanus toxin. *Chemistry and Physics of Lipids* 1996; 81(1):21–34

10. SAŽETAK

CENTRALNI UČINCI BOTULINUM TOKSINA TIP A NA NEUROTRANSMITERE I NEURONALNE MARKERE U KRALJEŽNIČNOJ MOŽDINI ŠTAKORA S LOKALNIM MIŠIĆNIM SPASTICITETOM

Mateja Banović, Mislav Barišić-Jaman

Botulinum toksin tip A jedan je od najšire primjenjivanih lijekova u liječenju lokalnih mišićnih hiperkinetičkih poremećaja. Nedavna istraživanja su pokazala mogući terapijski učinak djelovanja BoNT/A na razini centralnih motoneurona. U ovom radu želimo ispitati ovu hipotezu istražujući učinke BoNT/A na centralnu neurotransmisiju i neuronalne proteinske markere po prvi puta koristeći štakorski model fokalne mišićne hipertonijske u istraživanju njegova djelovanja.

Štakori su podijeljeni u četiri grupe: kontrolna (vehikulum+fiziološka otopina), TeNT+fiziološka otopina, vehikulum+BoNT/A i TeNT+BoNT/A.

Unilateralni mišićni spazam induciran je niskom dozom TeNT im. Farmakološki odgovor na im. i in. injekciju BoNT/A je zabilježen različitim motoričkim parametrima i testovima u svjesnih životinja. Kralježnična moždina štakora je analizirana na koncentracije glutamata i GABA-e ELISA metodom, a ekspresija VAMP-2, SV2C, CGRP i NeuN imunohistokemijski.

Rezultati bihevioralnih testova su pokazali da BoNT/A primijenjen i in. i im. smanjuje hipertoniju mišića. Mjerenjem ukupne koncentracije GABA-e i glutamata u tkivu ventralnog roga nije bilo moguće utvrditi potencijalno djelovanje BoNT/A na disbalans inhibicijske i ekscitacijske transmisije. U ventralnom je rogu detektiran pocijepani SNAP-25 nakon primjene BoNT/A i u mišić i u živac, što ukazuje na njegovo moguće centralno djelovanje. Međutim, objašnjenje antispastičkog djelovanja BoNT/A u središnjem živčanom sustavu zahtijeva daljnja istraživanja.

Ključne riječi: botulinum toksin tip A, tetanus toksin, kralježnična moždina, mišićni spazam, hiperkinetički poremećaji pokreta

11. SUMMARY

CENTRAL EFFECTS OF BOTULINUM TOXIN TYPE A ON SPINAL CORD NEUROTRANSMITTERS AND INHIBITORY NEURON MARKERS IN RATS WITH LOCAL MUSCULAR SPASTICITY

Mateja Banović, Mislav Barišić-Jaman

Botulinum toxin type A is one of the most widely used drugs in the treatment of local muscular hyperkinetic disorders. Recent studies have demonstrated the possible therapeutic effect of BoNT/A on the central motoneurons. In this paper we want to examine this hypothesis by investigating the effects of BoNT/A on central neurotransmission and neuronal protein markers using a rat model of focal muscle hypertonia.

The rats were divided into four groups: control (vehicle + saline), TeNT + saline, vehicle + BoNT/A and TeNT + BoNT/A.

Unilateral muscle spasm was induced by a low intramuscular dose of TeNT. The rat spinal cord was analyzed on glutamate and GABA concentrations by ELISA. The expression of VAMP-2, SV2C, CGRP and NeuN proteins was analyzed immunohistochemically.

The results of behavioral tests have shown that BoNT/A applied by intraneural and intramuscular route reduces muscle hypertonia. By measuring the total concentration of GABA and glutamate in ventral horn, it was not possible to determine the potential effect of BoNT/A on the inhibitory and excitatory transmission mismatch. In the ventral horn, cleaved SNAP-25 was detected after administration of BoNT/A in muscle and nerve, indicating its possible central activity. However, an explanation of the antispastic effect of BoNT/A in the central nervous system requires further research.

Key words: botulinum toxin type A, tetanus toxin, spinal cord, muscular spasticity, hyperkinetic movement disorders

12. ŽIVOTOPIS

Rođen sam u Zagrebu 21. veljače 1995. godine. Pohađao sam Osnovnu školu Malešnica te nakon toga Gimnaziju Lucijana Vranjanina u Zagrebu. Za uspjeh u srednjoj školi nagrađen sam stipendijom Grada Zagreba koju sam primao četiri godine. 2013. godine sam upisao Medicinski fakultet u Zagrebu te sam trenutno redovni student šeste godine studija. U akademskoj godini 2017./2018. Nagrađen sam dvjema rektorovim nagradama. Prva rektorova nagrada je bila za znanstveni rad Centralni učinci botulinum toksina tipa A na neurotransmitere i neuronalne markere u kralježničnoj moždini štakora s lokalnim mišićnim spasticitetom, dok je druga rektorova nagrada bila za humanitarnu akciju Medicinari velikog srca gdje su studenti prikupljali poklone za djecu koja će Božić provesti u bolnici. Također sam uključen i u izvannastavne aktivnosti gdje bih posebno istaknuo članstvo u udruzi CroMSIC gdje sam jedan od voditelja odbora. Tijekom školovanja sudjelovao sam na mnogim kongresima (CROSS, Zims, Global Students' Conference), a neke sam i organizirao (CroMSIC-ov simpozij o ljudskim pravima 2016. i 2017. godine te Balkan SCOPH Weekend 2018. godine). Pohađao sam i Dubrovnik Sumer School 2017. godine te sam bio na IFMSA razmjenu u Sankt Peterburgu u Saint Petersburg State Pediatric Medical University Hospital 2018. godine.