

Toksyna botulinowa i jej zastosowanie w medycynie

Botulinum toxin and its clinical applications

Marta Drożdżyńska¹, Izabela Sobieraj-Garbiak², Anna Chlasta³, Maria Jastrzębska¹

¹ Zakład Analityki Medycznej Katedry Diagnostyki Laboratoryjnej i Medycyny Molekularnej, Pomorski Uniwersytet Medyczny, Szczecin,

² Pracownia Diagnostyki Laboratoryjnej 109 Szpitala Wojskowego z Przychodnią Samodzielnego Publicznego Zakładu Opieki Zdrowotnej, Szczecin,

³ Samodzielna Pracownia Kształcenia Lekarza Rodzinnego, Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 2, Pomorski Uniwersytet Medyczny, Szczecin

Streszczenie

Botulina, egzotoksyna produkowana przez bakterie *C. botulinum*, jest jedną z najsilniejszych toksyn znanych człowiekowi. Mimo, że od niemal 40 lat jest z powodzeniem wykorzystywana w różnych dziedzinach medycyny, to nazwa Botox® ciągle kojarzy się głównie z medycyną estetyczną i mniej lub bardziej udanymi tzw. zabiegami upiększającymi. Celem niniejszej pracy było dokonanie przeglądu dostępnego piśmiennictwa i opis aktualnego stanu wiedzy na temat toksyny botulinowej. Botulina jest białkiem zbudowanym z dwóch łańcuchów połączonych ze sobą mostkiem disiarczkowym. Wyróżnia się siedem serotypów oznaczonych od A do G. Mechanizm działania botuliny polega na proteolizie specyficznych białek neuronalnych i blokadzie uwalniania acetylocholino z pęcherzyków presynaptycznych na poziomie połączeń nerwowo-mięśniowych. A. Scott jako pierwszy wykorzystał neurotoksynę botulinową do leczenia zez. Od tego czasu znalazła ona swoje zastosowanie w takich dziedzinach jak okulistyka, neurologia czy urologia. Botulina okazała się być bezpiecznym lekiem z niewielką liczbą działań niepożądanych, wśród których najbardziej niebezpiecznym jest dysfagia. Mimo, iż działanie botuliny jest odwracalne istnieje prawdopodobieństwo, szczególnie u pacjentów poddawanych długoletniej terapii, wytworzenia przeciwciał i wystąpienia klinicznej oporności. Od momentu odkrycia neurotoksyny botulinowa przeszła swoista przemianę od śmiertelnej trucizny do leku wykorzystywanego w wielu dziedzinach medycyny. Liczne badania potwierdzają, że botulina stosowana odpowiedzialnie przy użyciu najmniejszej efektywnej dawki, z zachowaniem wymaganych odstępów czasowych, jest bezpieczna dla organizmu i może stanowić dla lekarzy narzędzie terapeutyczne, które znacząco wpływa na poprawę jakości życia pacjentów zmniejszając lub całkowicie redukując objawy chorobowe.

Summary

Botulin, exotoxin produced by *C. botulinum*, is one of the most potent toxins known to the mankind. For nearly 40 years it has been successfully used in various fields of medicine, despite the word botox is still mainly associated with aesthetic medicine and more or less successful beauty treatments. The review of the literature and description of the current knowledge about botulinum toxin and its clinical applications was the aim of the study. Botulinum toxin is protein composed of two chains linked together by a disulfide bridge. Seven serotypes were distinguish and label from A to G. The botulinum toxin mechanism of action involves proteolysis of specific neuronal proteins which resulting in blockade of acetylcholine release from presynaptic vesicles at the neuromuscular junction. For the first time botulin was used by A. Scott in treatment of strabismus. Since then botulinum neurotoxin has found its application in such areas as ophthalmology, neurology and urology. Botulinum proved to be a safe drug with few adverse effects, among which dysphagia is the most dangerous. Although the effect of botulinum toxin is unstable and reversible, there is a possibility of appearance of antibodies and clinical resistance, particularly in patients undergoing long-term therapy. Since the discovery, botulinum neurotoxin, has undergone a transformation from the deadly poison to the drug used in many areas of medicine. Numerous studies confirm that botulin, when used responsibly with the smallest effective dose and required intervals, is safe for the organism. Botulin can be for physicians a therapeutic tool, which can bring relief from the symptoms and suffering and significantly improving patients quality of life.

Słowa kluczowe: toksyna botulinowa, serotypy, połączenie nerwowo-mięśniowe, dystonie, spastyczność, ból

Key words: botulinum toxin, serotypes, neuromuscular junction, dystonias, spasticity, pain

Wprowadzenie

Toksyna botulinowa (BoNT) jest egzotoksyną wytwarzaną przez bakterie *Clostridium botulinum* w warunkach beztlenowych i jedną

z najsilniejszych toksyn biologicznych znanych człowiekowi. Po raz pierwszy bakterie odpowiedzialne za wywołanie botulizmu (zatrucie jadem kiełbasianym) zostały wyizolowane ponad 100 lat

temu przez van Ermengema [1]. Botulina jest neurotoksyną, która blokuje transdukcję sygnału w α -motorycznych neuronach obwodowych poprzez hamowanie uwalniania acetylocholin w części presynaptycznej połączeń nerwowo-mięśniowych [2]. Wyróżnia się 7 podtypów serologicznych botuliny opisywanych od A do G, z których jedynie trzy – A, B i E są odpowiedzialne za wywołanie botulizmu [3, 4]. Według danych Państwowego Zakładu Higieny z 2014 roku liczba zachorowań na botulizm w Polsce wynosiła 29 przypadków na 100 tys. ludności a zapadalność kształtowała się na poziomie 0,08 i była nieco wyższa niż w roku poprzednim. [5]. Z punktu widzenia diagnostyki laboratoryjnego zatrucie toksyną botulinową postrzegane jest jako niezwykle groźne, bowiem neurotoksyna ta jest najsilniejszą z toksyn bakteryjnych, stanowiąca źródło dla potencjalnej broni biologicznej. Jednakże od niemal 40 lat jest z powodzeniem stosowana w celach leczniczych, mimo iż jej znaczenie dla konwencjonalnej medycyny jest często bagatelizowane. Nazwa „Botox” kojarzy się głównie z medycyną estetyczną i mniej lub bardziej udanymi tzw. zabiegami upiększającymi. Większość społeczeństwa nie zdaje sobie jednak sprawy z liczby zastosowań neurotoksyny botulinowej, od lat z bardzo dobrym skutkiem stosowanej w takich dziedzinach medycyny jak: okulistyka, neurologia, ortopedia, laryngologia czy stomatologia. Celem niniejszej pracy było dokonanie przeglądu dostępnego piśmiennictwa i opis aktualnego stanu wiedzy na temat toksyny botulinowej i jej wykorzystania w medycynie. Wobec bardzo szybko rosnącej popularności stosowania preparatów BoNT, mogą pojawić się również działania niepożądane. Wydaje się, że wiedza ta może także zainteresować diagnostów laboratoryjnych, szczególnie o specjalności mikrobiologicznej, prowadzących diagnostykę botulizmu w ośrodkach sanitarno-epidemiologicznych.

Opis stanu wiedzy

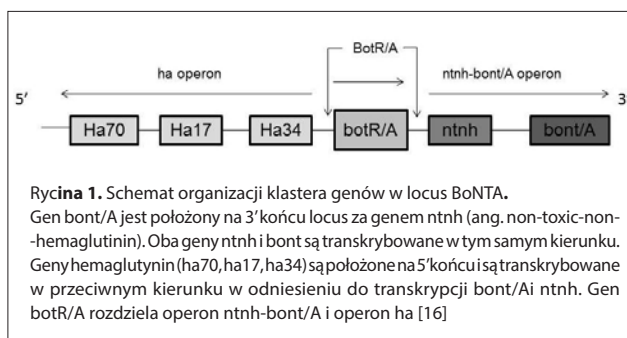
1. Rys historyczny

Botulizm po raz pierwszy został opisany w 1817 roku w Niemczech, jako skutek zatrucia po spożyciu kiełbasy. Miejscowy lekarz Justyn Kerner zebrał dane na temat 230 przypadków zatrucia jadem kiełbasianym i od tego czasu chorobę tę określano jako „choroba Kenera” [6]. Dopiero w 1897 roku, E. P. van Ermengem wyizolował obowiązkowo beztlenowe, Gram dodatnie, tworzące spory, laseczki *Clostridium botulinum* [1]. Już w 1928 r. Snipe i Sommer podjęli się pierwszej próby oczyszczenia toksyny. Celem ich badań było wykorzystanie botuliny w medycynie, ale także jej zastosowanie jako potencjalnej broni biologicznej [7]. Jako pierwszy toksynę botulinową w formie krystalicznej uzyskał w 1944 roku Edward Schantz [8]. Na początku drugiej połowy XX w. dr Alan Scott rozpoczął testy z wykorzystaniem serotypu A toksyny botulinowej na małpach w celu wywołania rozluźnienia kurczu powiek u badanych zwierząt [9]. W 1978r. uzyskał on zgodę Amerykańskiej Agencji ds. Żywności i Leków (FDA; *US Food and Drugs Administration*) na badania wykorzystujące serotyp A toksyny botulinowej w leczeniu zęza u ludzi. Wyniki swojej pracy opublikował w 1980 roku [10]. W 1988 roku firma Allergan odkupiła od dra Scotta prawa do sprzedaży botuliny typu A produkowanej wówczas pod nazwą Oculinum. W 1989 roku firma Allergan zmieniła nazwę produkowanej tok-

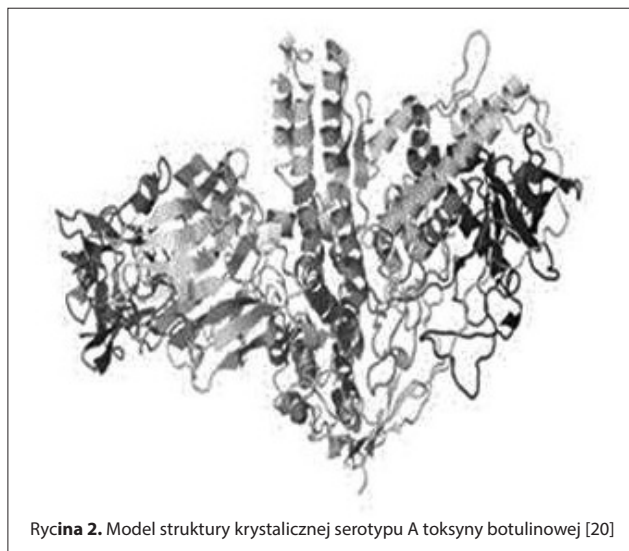
syny botulinowej typu A na Botox® i uzyskała od FDA licencję na produkcję Botoksu® w celach leczniczych (leczenie zęza, kurczu powiek, spastyczności mięśni i przykurczy). Dopiero w 2000 r. FDA zezwoliło na stosowanie toksyny botulinowej w leczeniu dystonii szyjnej i jako środka przeciwbólowego, a w 2002 r. w medycynie estetycznej w celu redukcji zmarszczek gładziny czoła [11-14].

2. Budowa molekularna

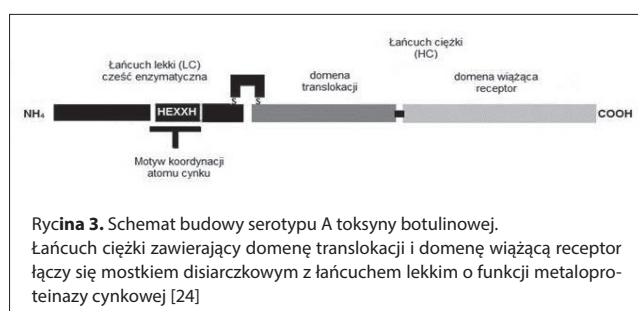
Neurotoksyna botulinowa (BoNT) ulega transkrypcji i translacji jako monomeryczne białko o małej aktywności proteolitycznej i masie ok. 150 kDa. BotR/A jest dodatnim regulatorem transkrypcji BoNT i jednocześnie związanym z nią zespołem białek, który często jest transkrybowany jako zbiór (*ang. cluster*) trzech policistronowych transkryptów [15]. Klaster ten nazywany jest locus botuliny i jest położony w obrębie ruchomego elementu genetycznego, który w zależności od szczepu występuje w różnych miejscach genomu *Clostridium botulinum* (typy A, B, E i F znajdują się na chromosomie, typ G na plazmidzie, typy C i D na bakteriofagu). Organizację locus botuliny przedstawia rycina 1 [16].



Toksyna botulinowa łączy się z innymi nietoksycznymi białkami, które ulegają wcześniejszej transkrypcji i translacji razem z genem kodującym BoNT. Białka te zawierają komponenty o aktywności hemaglutynin i tworzą z toksyną botulinową niekonwalencyjne, pH-stabilne kompleksy, których powstanie nie jest jednak niezbędne do wywołania jej pełnej toksyczności [17, 18, 19]. BoNT jest monomerem, w którego budowie wyróżnia się dwa łańcuchy połączone ze sobą mostkiem disiarczkowym [19]. Strukturę krystaliczną toksyny botulinowej przedstawia rycina 2. Część



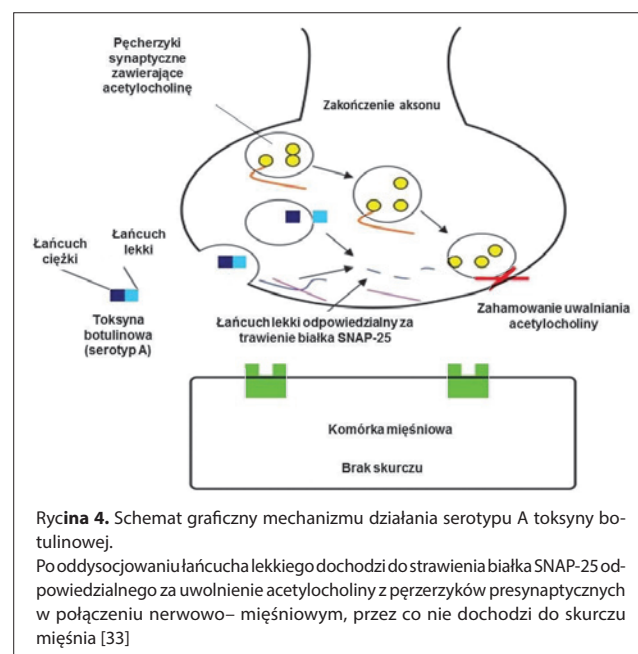
N-końcówką białka stanowi łańcuch lekki (LC) o masie ok. 50 kDa (448 aminokwasów) i funkcji metaloproteiny cynkowej z charakterystycznym dla rodziny termolizyn motywem koordynującym atom cynku (HEXXH) [2, 21]. Natomiast część C-końcówką BoNT tworzy łańcuch ciężki (HC) o masie ok. 100 kDa (848 aminokwasów) składający się z dwóch funkcjonalnych domen, z których jedna jest odpowiedzialna za rozpoznawanie receptorów (HCR) a druga za przemieszczenie łańcucha lekkiego przez błonę endosomalną (HCT) (ryc. 3) [19, 21]. Krzyżowa neutralizacja przeciwciał pozwala na wyróżnienie siedmiu serotypów w obrębie neurotoksyny botulinowej oznaczonych od A-G [3, 4]. Według ostatnich doniesień amerykańskich naukowców istnieje także serotyp H [22, 23],



3. Mechanizm działania

Działanie BoNT poza serotypem C w neuronach jest zależne od powstania pęcherzyków ułatwiających przejście toksyny do komórek nerwowych [25, 26]. Integralnymi składowymi pęcherzyków synaptycznych ułatwiającymi fuzję z błoną plazmatyczną neuronów są białka: SV2 oraz synaptotagminy I i II [27, 28]. Badacze wykazali, że domena wiążąca receptory łańcucha ciężkiego neurotoksyny botulinowej łączy się z kompleksem białek pęcherzyka synaptycznego, w którego skład wchodzi m. in. ATP-aza protonowa, synaptofizyna, SV2 i synaptotagminy [29]. Po fuzji pęcherzyka zawierającego toksynę z błoną komórkową neuronu kompleks BoNT – receptor ulega endocytozie na drodze zależnej od białek klatryny i dynaminy [27]. Translokacja łańcucha lekkiego odbywa przy udziale domeny translokacji położonej w obrębie łańcucha ciężkiego i jest zależna od pH, co sugeruje, że powstanie por i translokacja LC wymaga zmiany konformacji całej cząsteczki BoNT [30]. Badania sugerują także, że jednorazowa translokacja LC może przebiegać niezależnie od pH jednak zakwaszenie jest wymagane do odsłonięcia i transportu LC przez pory powstałe przy udziale HC [31, 32].

Mechanizm działania neurotoksyny botulinowej polega na blokowaniu uwalniania acetylocholin z pęcherzyków presynaptycznych na poziomie połączeń nerwowo-mięśniowych mięśni szkieletowych powodując tym samym hamowanie przekazywania impulsów nerwowych do części motorycznej płytki i w konsekwencji porażenia mięśnia [2], co graficznie zostało przedstawione na rycinie 4 [33].



Poszczególne serotypy BoNT mimo wywoływania podobnego efektu końcowego działają w nieco odmienny sposób powodując proteolizę różnych białek cytoplazmatycznych, błonowych i pęcherzykowych zapobiegając tym samym połączeniu się pęcherzyka zawierającego acetylocholinę z błoną presynaptyczną. Białkami, które ulegają proteolizie pod wpływem BoNT są SNAP-25, VAMP-2 oraz syntaksyna 1 a i b [24]. Poszczególne serotypy BoNT oraz białka, które ulegają proteolizie pod ich wpływem przedstawia tabela I.

4. Zastosowanie toksyny botulinowej w medycynie

Neurotoksynę botulinową A po raz pierwszy w badaniach nad jej ewentualnym wykorzystaniem w celach terapeutycznych u ludzi zastosował amerykański okulista Alan Scott [10]. Po uzyskaniu przez firmę Allergan licencji na produkcję Botoksu® w celach terapeutycznych w 1989 r. serotyp A BoNT znalazł zastosowanie w bardzo wielu dziedzinach medycyny, co obrazuje tabela II.

Tabela I. Serotypy BoNT, ich substraty oraz miejsca proteolizy

Serotyp BoNT	Substrat	Miejsce proteolizy	Piśmiennictwo
BoNT/A	SNAP-25	glutamina ₁₉₇ /arginina ₁₉₈	34
BoNT/B	VAMP-2/ synaptobrewina	glutamina ₇₆ /fenyloalanina ₇₇	35
BoNT/C	SNAP-25;	arginina ₁₉₈ /alanina ₁₉₉	36
	syntaksyna 1 a,b	lizyna ₂₅₃ /alanina ₂₅₄	37
BoNT/D	VAMP-2/ synaptobrewina	lizyna ₅₉ /leucyna ₆₀	38
BoNT/E	SNAP-25	arginina ₁₈₀ /izoleucyna ₁₈₁	34
BoNT/F	VAMP-2	alanina ₈₁ /alanina ₈₂	39
BoNT/G	VAMP-2	glutamina ₇₆ /fanyloalanina ₇₇	40

Tabela II. Zastosowanie toksyny botulinowej A w medycynie

Dziedzina medycyny	Rodzaj schorzenia	Piśmiennictwo
Okulistyka	Różne postaci zeza: zez towarzyszący zbieżny, rozbieżny, jawny, ukryty, wrodzony, porażenny, resztkowy zez pooperacyjny, niedobór konwergencji; Oczopląs i inne nabyte zaburzenia ruchomości gałek ocznych; Czynnościowe nadmierne łzawienie; Niedomykalność powiek; Zamierzone uzyskanie przejściowego opadnięcia powieki górnej; Retrakcja powiek; Myokimie; Spastyczne podwinięcie brzegów powieki;	[41, 42]
Neurologia	Dystonie: – ogniskowe: zespół Meige, dystonia oralno– żuchwowa, dystonia języka, bruksizm, spastyczny kurcz powiek, dystonia szyjna, dystonia gardłowa, dystonia krtaniowa; – dystonie segmentalne, – dystonia osiowa – dystonia uogólniona – dystonie objawowe: zespół Hallervordena– Spatz'a Spastyczność: – ogniskowa kończyn, – nieogniskowa: hemispastyczność, paraspastyczność, tetraspastyczność; Połowiczny kurcz twarzy; Synkinezy po nieprawidłowej reinerwacji; Tiki nerwowe; Porażenia mózgowe; Porażenia nerwu twarzowego i zespół krokodylich łez; Synkineza po samoistnym porażeniu nerwu twarzowego; Nadmierna potliwość: – ogniskowa: pach, dłoni, stóp, – rozproszona; Nadmierne ślinienie; Zespoły Parkinsonowskie; Stwardnienie zanikowe boczne; Drżenia mięśniowe; Ból: – mięśniowy: spowodowany dystoniami, spastycznością, fibromyalgią, przewlekłymi bólami mięśni twarzy, przewlekłymi zespołami bólowymi mięśni przykręgosłupowych, – niemięśniowe: migrena, ból neuropatyczny, ból nerwu trójdzielnego, bóle fantomowe; Inne: – zespół Reynaud – nie poddające się leczeniu epileptyczne napady ogniskowe	[43, 44]
Urologia	Dyssynergia mięśnia wypieracza i zwieracza; Idiopatyczna nadaktywność mięśnia wypieracza; Neurogenna nadaktywność mięśnia wypieracza; Zatrzymywanie moczu; Zespół bólu pęcherza; Kurcz mięśni dna miednicy; Łagodny przerost gruczołu krokowego;	[43, 44]
Otolaryngologia	Pocenie smakowe (zespół Fray'a); Przewlekłe zapalenie błony śluzowej nosa; Ziarniniaki krtani; Blokada głośni;	[43, 44, 45]
Pediatria	Mózgowe porażenie dziecięce;	[42]
Gastro- enterologia	Achalazja przełyku; Kurcz mięśnia pierścienno– gardłowego (zwieracza dolnego gardła); Kurcz zwieracza wpustu; Przerostowe zwężenie odźwiernika; Choroba Hirschprunga; Kurcze zwieracza Oddiego; Gastropareza; Inne: szczeliny odbytu; proctalgia fugax, anismus, otyłość	[43, 44, 46]
Ortopedia	Dynamiczna stopa końsko– szpotawa	[43, 44]
Medycyna estetyczna	Zmarszczki gładziny czoła; Zmarszczki dolnych kątów oczu;	[43, 44]

Neurotoksynę botulinową B stosowano w leczeniu: dystonii szyjnej, nadmiernej potliwości, różnych stanów spastycznych, porażenia mózgowego, połowiczego kurczu twarzy, zaburzeń czynności pęcherza, dystonii krtani, nadmiernego ślinienia, szczeliny odbytu, różnych stanów bólowych oraz w medycynie estetycznej [47].

W badaniach klinicznych, wykorzystywano także BoNT/F, która okazała się mieć krótszy czas działania, podobnie jak serotyp E, w porównaniu z BoNT A [48, 49, 50]. BoNT/C wykazywała podobne właściwości co serotyp A i była wykorzystywana w leczeniu dystonii [51]. Toksyna botulinowa typu F była stosowana w leczeniu dystonii pacjentów, którzy wytworzyli przeciwciała lub charakteryzowali się kliniczną opornością na zastosowany wcześniej serotyp A BoNT [50, 52].

Efekt działania neurotoksyny botulinowej jest krótki (ok. 3 miesięcy) i odwracalny (nietrwały). Dzieje się tak z powodu występowania procesu tzw. „kiełkowania” (*ang. sprouting*), czyli odrostów części aksonalnej neuronów motorycznych i ponownej aktywacji synaps [53]. Z punktu widzenia leczniczego w przypadku terapii chorób przewlekłych proces ten jest mało korzystny, jednakże w przypadku źle przeprowadzonej terapii, lub wystąpienia efektów niepożądanych proces porażenny jest całkowicie odwracalny. Mimo tak wielu opisanych zastosowań neurotoksyny botulinowej jedynie dwa jej serotypy znalazły zastosowanie w rutynowej praktyce medycznej, mianowicie serotyp A i B. Według producentów preparaty te, w stosunku do możliwości, mają znacznie ograniczoną liczbę zastosowań leczniczych (tabela II).

Tabela III. Właściwości preparatów zawierających toksynę botulinową

	Botox®	Dysport®	Xeomin®	NeuroBloc® Myobloc®
Producent	Allergan Inc. Irvine, CA, USA	Ipsen Pharma Boulogne-Billancourt, Francja	Merz Pharmaceuticals Frankfurt/M, Niemcy	US WorldMed Louisville, KY, USA
Postać farmaceutyczna	proszek	proszek	proszek	Roztwór gotowy do użycia 5000 MU-E/ml
Temperatura przechowywania	poniżej 8 °C	poniżej 8 °C	poniżej 25 °C	poniżej 8 °C
Trwałość	36 m-cy	24 m-ce	36 m-cy	24 m-ce
Typ toksyny botulinowej	A	A	A	B
Szczep <i>Clostridium botulinum</i>	Hall A	Szczep Ipsen	Hall A	Bean B
Substrat	SNAP25	SNAP25	SNAP25	VAMP
Procesy oczyszczania	Precypitacja i chromatografia	Precypitacja i chromatografia	Precypitacja i chromatografia	Precypitacja i chromatografia
Wartość pH w rekonstruowanym preparacie	7.4	7.4	7.4	5.6
Stabilizacja	Suszenie próżniowe	liofilizacja	Suszenie próżniowe	Redukcja pH
Substancje pomocnicze	Albumina ludzka 500 µg/100 MU- w fiolce NaCl 900 µg/100 MU- w fiolce bufor	Albumina ludzka 125 µg/500 MU- w fiolce laktoza 2500 µg/100 MU- w fiolce bufor	Albumina ludzka 1000 µg/100 MU- w fiolce sacharoza 4.7 mg/100 MU- fiolka bufor	Albumina ludzka 500 µg/ml; bursztynian disodowy 0,01 M; Chlorek sodu 0,1 M; H ₂ O; HCl;
Aktywność biologiczna	50/100 MU-A /fiolkę	500 MU-I/ fiolkę	50/100 MU-M /fiolkę	1.0/2.5/10.0 kMU-E /fiolkę
Aktywność biologiczna w stosunku do Botox®	1	1:2-1:3	1	1:40
Specyficzna aktywność biologiczna	60 MU-EV/ngBNT	100 MU-EV/ngBNT	167 MU-EV/ngBNT	5 MU-EV/ngBNT

BNT: neurotoksyna botulinowa; MU-A: jednostka w teście letalności myszy prowadzonym przez firmę Allergan; MU-E: jednostka w teście letalności myszy Solistice; MU-I: jednostka w teście letalności myszy prowadzonym przez firmę Ipsen; MU-M: jednostka w teście letalności myszy prowadzonym przez firmę Merz; MU-EV: jednostka równoważnikowa, 1 MU-EV = 1 MU-A = 1 MU-M = 3 MU-I = 40 MU-E [42].

Obecnie na rynku farmaceutycznym działają cztery firmy produkujące preparaty zawierające neurotoksynę botulinową. Ich główne produkty wraz z opisem ich właściwości przedstawiono w tabeli III.

4.1. Wskazania lecznicze do stosowania toksyny botulinowej w Polsce

Najdłużej obecny na rynku i najlepiej poznany preparat Botox®, zawierający serotyp A neurotoksyny botulinowej, ma w Polsce następujące wskazania do stosowania:

- kurcz powiek;
- połowiczny kurcz twarzy i związane z nim ogniskowe dystonie;
- idiopatyczny kręcz karku (dystonia szyjna);
- ogniskowe przykurcze (spastyczność): związane z dynamiczną deformacją stopy końsko- spotaowej u dzieci z mózgowym porażeniem dziecięcym w wieku dwóch lat i starszych oraz nadgarstka i dłoni u pacjentów dorosłych po udarze;
- leczenie zmarszczek gładziny czoła spowodowanych nadmiernym kurczeniem się mięśnia marszczącego brwi oraz mięśnia podłużnego nosa;

- uporczywa ciężka, pierwotna nadpotliwość pach oporna na leczenie miejscowe;
- profilaktyka bólów głowy u pacjentów dorosłych cierpiących na przewlekłą migrenę (ból głowy występujący 15 dni w miesiącu lub częściej);
- nietrzymanie moczu u pacjentów dorosłych z nadreaktywnością mięśnia wypieracza pęcherza moczowego o podłożu neurogennym po stabilnych urazach rdzenia kręgowego poniżej odcinka szyjnego oraz u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym;
- idiopatyczna nadreaktywność pęcherza moczowego z objawami nietrzymania moczu, parciem nagłym lub częstomoczem, u pacjentów dorosłych, z niewystarczającą odpowiedzią lub z nadwrażliwością na leki antycholinergiczne [45].

W przypadku preparatów zawierających BoNT typu B jedynym wskazaniem jest leczenie dystonii szyjnej u dorosłych [46].

4.2. Przeciwwskazania do stosowania BoNT

Przeciwwskazaniem do stosowania preparatów zawierających neurotoksynę botulinową jest ogólnie pojęta nadwrażliwość na

kompleks neurotoksyny lub jakiegokolwiek inny składnik leku a także niektóre zaburzenia funkcji mięśni np. *miastenia gravis* lub zespół Eaton– Lamberta. Nie zaleca się także stosowania preparatów zawierających BoNT przez kobiety ciężarne i karmiące piersią [54, 55].

4.3. Działania niepożądane

Jak każdy produkt leczniczy tak i preparaty zawierające neurotoksynę botulinową mogą wywoływać działania niepożądane. Obserwowanymi działaniami niepożądanymi są między innymi: zwiększone drżenie mięśni odległych od miejsca podania – szczególnie w przypadku pacjentów leczonych z powodu dystonii szyjnej, dysfagia, suchość w jamie ustnej a w rzadkich przypadkach mogą występować reakcje alergiczne w tym trwała wysypka, reakcje miejscowe oraz obustronne opadanie powiek w przypadku ostrzykiwania mięśni szyi [43, 56]. W bardzo rzadkich przypadkach ciężkiej dysfagii donoszono o wystąpieniu zapalenia płuc a nawet śmierci [45]. Większy odsetek dysfagii przy terapii BoNT obserwowano podczas używania preparatu NeuroBloc[®]/Myobloc[®], mniejszy w przypadku stosowania preparatu Dysport[®], a najmniejszy w przypadku używania preparatu Botox[®]. Niemniej jednak w ciągu półtorej dekady leczenia pacjentów z dystonią szyjną, przy której stosowane są najwyższe dawki neurotoksyny botulinowej, nie odnotowano żadnych doniesień o uogólnionym osłabieniu mięśni, u pacjentów bez innych chorób neurologicznych, przy stosowaniu dawek zalecanych przez producenta [43, 54, 55].

4.4 Występowanie przeciwciał i oporności klinicznej

Każda terapia z zastosowaniem obcego białka jako substancji leczniczej niesie za sobą możliwość wystąpienia reakcji ze strony układu immunologicznego, niekorzystnej z klinicznego punktu widzenia. Wielkość kompleksów białkowych stosowanych w preparatach leczniczych BoNT oraz ich pochodzenie bakteryjne sprawia, że są one wysoce immunogenne. Stosowanie dużych dawek neurotoksyny botulinowej A (≥ 250 U na sesję przy użyciu preparatu Botox[®] lub dawki równoważnej dla innych preparatów) oraz ostrzykiwania częstsze niż raz na 3 m-ce są potencjalnymi czynnikami ryzyka wytworzenia przeciwciał i zwiększają ryzyko klinicznej oporności. Jednakże stosowanie najniższej dawki efektywnej oraz przynajmniej trzymiesięcznych przerw pomiędzy iniekcjami niesie za sobą bardzo niskie ryzyko wytworzenia przeciwciał i klinicznej oporności, co jest szczególnie istotne dla pacjentów poddawanych długoletniej terapii [41].

W przypadku stosowania preparatów zawierających BoNT mogą wystąpić dwa rodzaje przeciwciał: przeciwciała nieneutralizujące, które nie mają żadnego istotnego wpływu na oddziaływanie BoNT w obrębie połączenia nerwowo-mięśniowego oraz przeciwciała neutralizujące (blokujące), które bezpośrednio łączą się z łańcuchem ciężkim toksyny uniemożliwiając jej terapeutyczne działanie. Nieneutralizujące przeciwciała anti-BoNT/A dają reakcje krzyżowe z innymi serotypami neurotoksyny botulinowej jednak nie ma to znaczenia klinicznego [57].

Jeśli u pacjenta wystąpią przeciwciała blokujące anti-BoNT/A i oporność kliniczna szansą na przedłużenie skutecznej terapii

może być zastosowanie preparatu zawierającego BoNT/B, gdyż nie odnotowano dotychczas występowania przeciwciał neutralizujących, o krzyżowej reaktywności [41]. Jednakże jak sugerują niektórzy badacze, w przypadku wystąpienia u pacjenta przeciwciał blokujących przeciwko jednemu serotypowi zastosowanie innego serotypu może przynieść jedynie krótkotrwały efekt z uwagi na duże ryzyko gwałtownego rozwoju oporności [57, 58].

Podsumowanie

Od momentu odkrycia toksyny botulinowej przeszła ona swoistą rewolucję od śmiertelnej trucizny po lek wykorzystywany w wielu dziedzinach medycyny. Właściwości tej neurotoksyny stwarzają możliwość selektywnego wyłączenia nadreaktywnych mięśni, które są nieporównywalne z żadną inną metodą. Jak potwierdzają liczne, prowadzone od ok. 1980 roku badania, BoNT stosowana w najmniejszej efektywnej dawce, przez wykwalifikowany personel medyczny i z zachowaniem wymaganych odstępów czasowych pomiędzy iniekcjami, jest bezpieczna dla organizmu. Bezpieczeństwo terapii przy zastosowaniu neurotoksyny botulinowej dodatkowo potwierdzają zarówno niewielka ilość działań niepożądanych jak i odwracalność efektów działania.

Terapie z użyciem BoNT są ważnym przykładem w badaniach transzlacyjnych, które opierają się na relacji pomiędzy ciągłą obserwacją kliniczną a odkryciami w takich dziedzinach jak biochemia, biologia molekularna czy neurofizjologia. Ciągłe jednak istnieją schorzenia, w których zastosowanie BoNT/A przyniosło wymierne efekty terapeutyczne, pomimo, że nie jest znany mechanizm jej działania leczniczego. Badania z zakresu medycyny laboratoryjnej w połączeniu z dobrą obserwacją kliniczną mają szansę pomóc w rozwiązaniu problemów terapeutycznych i dokładniej wyjaśnić mechanizm działania BoNT w niektórych jednostkach chorobowych.

Obecnie badania naukowców skupiają się na syntezie rekombinowanej genetycznie toksyny botulinowej lub części składowych jej struktury białkowej, w celu pozyskania wysokooczyszczonego białka, lub jego nietoksycznych struktur, które mogłyby w przyszłości stanowić źródło antygenów stosowanych w szczepionkach zapobiegających zatruciom jadem kiełbasianym [59,60].

Toksyna botulinowa w krótkim czasie dołączyła do grona innowacyjnych leków, mających zastosowanie w różnych dziedzinach medycyny, które bezpośrednio przyczyniły się do zmniejszenia ludzkiego cierpienia. Stosowana w sposób odpowiedzialny może być dla lekarzy narzędziem terapeutycznym znacząco wpływającym na poprawę jakości życia pacjentów.

Piśmiennictwo

1. van Ermengem E. Ueber einen neuen anaeroben Bacillus and seine Beziehungen zum Botulismus. Ztsch Hyg Infekt 1897; 26: 1.
2. Schiavo G, Rossetto O, Santucci A, et al. Botulinum neurotoxins are zinc proteases. Journal of Biological Chemistry 1992; 267: 23479–23483.
3. Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. Physiol Rev 2000; 80: 717766.
4. Smith TJ, Lou J, Geren IN, et al. Sequence variation within botulinum neurotoxin serotypes impacts antibody binding and neutralization. Infect Immun 2005; 73: 5450–5457.
5. Informacje o zachorowaniach na choroby zakaźne i zatruciach w Polsce w 2014 roku. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego. Państwowy Zakład Higieny.

- Zakład Epidemiologii. Pracownia Monitorowania i Analizy Sytuacji Epidemiologicznej. http://www.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/2014/index_mp.html
6. Dickson EC. Botulism. A clinical and experimental study. *Rockefeller Inst Med Res Mong* 1918; 8: 1.
 7. Snipe PT, Sommer H. Studies on botulinus toxin. *J Infect Dis* 1928; 43: 52-160.
 8. Erbguth F. Historical notes on botulism, *Clostridium botulinum*, botulinum toxin, and the idea of the therapeutic use of the toxin. *Mov Disord* 2004; 19 Suppl 8: S2-6.
 9. Johnson E. Clostridial toxins as therapeutic agents: benefits of nature's most toxic proteins. *Annu Rev Microbiol* 1999; 53: 551-75.
 10. Scott AB. Botulinum toxin injection into extraocular muscles as an alternative to strabismus surgery. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 1980; 17(1): 21-25.
 11. Schantz E, Johnson E. Botulinum toxin: the story of its development for the treatment of human disease. *Perspect Biol Med* 1997 Spring; 40(3): 317-27.
 12. Binder W, Brin M, Blitzer A, Pogoda J. Botulinum toxin type A (BOTOX) for treatment of migraine. *Dis Mon* 2002; 48(5): 323-35.
 13. Erbguth F, Naumann M. Historical aspects of botulinum toxin: Justinus Kerner (1786-1862) *Neurology* 1999; 53(8): 1850-3. and the "sausage poison"
 14. Dressler D, Saberi F, Barbosa E. Botulinum toxin: mechanisms of action. *Arq Neuropsiquiatr* 2005; 63(1): 180-5. Epub 2005 Apr 13.
 15. Dineen SS, Bradshaw M, Karasek CE, et al. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the type A2 neurotoxin gene cluster in *Clostridium botulinum*. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 235: 9-16.
 16. Mazurkiewicz- Pisarek A, Plucienniczak A. Toksyna botulinowa- cudowna trucizna. *Biotechnologia* 2009; 2(85): 123-133.
 17. Oguma K, Inoue K, Fuginaga Y, et al. Structure and function of *Clostridium botulinum* protenitor toxin. *J Toxicol* 1999; 18: 17-34.
 18. Quinn CP, Minton NP. Clostridial neurotoxins. W: Durre, HBaP, (red.) *Clostridia*. Willey-VCH; Weinheim. 2001; p. 211-250.
 19. Sharma SK, Ramzan MA, Singh BR. Separation of the components of type A botulinum neurotoxin complex by electrophoresis. *Toxicon* 2003; 41: 321-331.
 20. RCSB Protein Data Bank. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3BTA> (dostęp 2009.02.23).
 21. Bandyopadhyay S, Clark AW, DasGupta BR, et al. Role of the heavy and light chains of botulinum neurotoxin in neuromuscular paralysis. *J Biol Chem* 1987; 262: 2660-2663.
 22. Dover N, Barash JR, Hill KK, et al. Molecular characterization of a novel botulinum neurotoxin type h gene. *J Infect Dis* 2014; 209(2): 192-202.
 23. Barash JR, Arnon SS. A novel strain of *Clostridium botulinum* that produces type B and type H botulinum toxins. *J Infect Dis* 2014; 209(2): 183-91.
 24. Henkel JS, Baldwin MR, Barbieri JT: Toxins from bacteria. *EXS* 2010; 100: 1-29.
 25. Dong M, Yeh F, Tepp WH, et al. SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A. *Science* 2006; 312: 592-596.
 26. Dong M, Richards DA, Goodnough MC, et al. Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells. *J Cell Biol* 2003; 162: 1293-1303.
 27. Jung N, Haucke V. Clathrin-mediated endocytosis at synapses. *Traffic* 2007; 8: 1129-1136.
 28. Morgans CW, Kensel-Hammes P, Hurley JB, et al. Loss of the Synaptic Vesicle Protein SV2B results in reduced neurotransmission and altered synaptic vesicle protein expression in the retina. *PLoS ONE* 2009; 4: e5230.
 29. Baldwin MR, Barbieri JT. Association of Botulinum neurotoxins with synaptic vesicle protein complexes. *Toxicon* 2009; 54(5): 570-574.
 30. Fischer A, Mushrush DJ, Lacy DB, et al. Botulinum neurotoxin devoid of receptor binding domain translocates active protease. *PLoS Pathog* 2008; 4(12): e1000245.
 31. Fischer A, Montal M. Single molecule detection of intermediates during botulinum neurotoxin translocation across membranes. *PNAS* 2007; 104: 10447-10452.
 32. Montal M. Translocation of botulinum neurotoxin light chain protease by the heavy chain protein- conducting channel. *Toxicon* 2009; 54(5): 565-569.
 33. Tremaine A, McCullough J. Botulinum toxin type A for the management of glabellar rhytids. *Clin Cosmet Invest Dermatol* 2010; 3: 15-23.
 34. Binz T, Blasi J, Yamasaki S, et al. Proteolysis of SNAP-25 by types E and A botulinum neurotoxins. *J Biol Chem* 1994; 269: 1617-1620.
 35. Schiavo G, Benfenati F, Poulain B, et al. Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* 1992; 359: 832-835.
 36. Schiavo G, Shone CC, Bennett MK, et al. Botulinum neurotoxin type C cleaves a single Lys-Ala bond within the carboxyl-terminal region of syntaxins. *J Biol Chem* 1995; 270: 10566-10570.
 37. Williamson LC, Halpern JL, Montecucco C, et al. Clostridial neurotoxins and substrate proteolysis in intact neurons: botulinum neurotoxin C acts on synaptosomal-associated protein of 25 kDa. *J Biol Chem* 1996; 271: 7694-7699.
 38. Schiavo G, Rossetto O, Catsicas S, et al. Identification of the nerve terminal targets of botulinum neurotoxin serotypes A, D, and E. *J Biol Chem* 1993; 268: 23784-23787.
 39. Schiavo G, Shone CC, Rossetto O, et al. Botulinum neurotoxin serotype F is a zinc endopeptidase specific for VAMP/synaptobrevin. *J Biol Chem* 1993; 268: 11516-11519.
 40. Schiavo G, Malizio C, Trimble WS, et al. Botulinum G neurotoxin cleaves VAMP/synaptobrevin at a single Ala-Ala peptide bond. *J Biol Chem* 1994; 269: 20213-20216.
 41. Dutton JJ, Fowler AM. Botulinum toxin in ophthalmology. *Surv Ophthalmol* 2007; 52(1): 13-31.
 42. Dressler D. Clinical applications of botulinum toxin. *Curr Opin Microbiol* 2012; 15(3): 325-336.
 43. Wheeler A, Smith HS. Botulinum toxins: mechanisms of action, antinociception and clinical applications. *Toxicology* 2013; 306: 124-146.
 44. Brin MF, Stewart C, Blitzer A, et al. Laryngeal botulinum toxin injections for disabling stuttering in adults. *Neurology* 1994; 44(12): 2262-2266.
 45. Albanese A, Bentivoglio AR, Cassetta E, et al. Review article: the use of botulinum toxin in the alimentary tract. *Aliment Pharmacol Ther* 1995; 9(6): 599-604.
 46. Dressler D, Eleopra R. Clinical use of non-A botulinum toxins: botulinum toxin type B. *Neurotox Res* 2006; 9(2-3): 121-125.
 47. Greene P, Fahn S. Use of botulinum toxin type-F injections to treat torticollis in patients with immunity to botulinum toxin type-A. *Mov Disord* 1993; 8: 479-483.
 48. Houser MK, Sheehan GL, Lees AJ. Further studies using higher doses of botulinum toxin type F for torticollis resistant to botulinum toxin type A. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 64: 577-580.
 49. Eleopra R, Tugnoli V, Rossetto O, et al. Different time courses of recovery after poisoning with botulinum neurotoxin serotypes A and E in humans. *Neurosci Lett* 1998; 256: 135-138.
 50. Eleopra R, Tugnoli V, Rossetto O, et al. Botulinum neurotoxin serotype C: a novel effective botulinum toxin therapy in human. *Neurosci Lett* 1997; 224: 91-94.
 51. Chen R, Karp BI, Hallett M. Botulinum toxin type F for treatment of dystonia: long-term experience. *Neurology* 1998; 51(5): 1494-1496.
 52. Holds JB, Alderson K, Fogg SG, et al. Motor nerve sprouting in human orbicularis muscle after botulinum A injection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31(5): 964-967.
 53. Charakterystyka produktu leczniczego Botox[®] http://www.urpl.gov.pl/system/drugs/dki/charakterystyka/2013-07-05_pl-spc-botox_200u-nat-pl-2013.06.10.pdf (dostęp: 2013.06.10).
 54. SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS NeuroBloc[®] http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000301/WC500026906.pdf (dostęp: 2013.07.21).
 55. LeWitt PA, Trosch, RM. Idiosyncratic adverse reactions to intramuscular botulinum toxin type A injection. *Mov Disord* 1997; 12: 1064-1067.
 56. Dressler D. Clinical presentation and management of antibody-induced failure of botulinum toxin therapy. *Mov Disord* 2004; 19(8): 92-100.
 57. Atazzi MZ. Basic immunological aspects of botulinum toxin therapy. *Mov Disord* 2004; 19(8): 68-84.
 58. Dressler D, Bigalke H, Benecke R. Botulinum toxin type B in antibody-induced botulinum toxin type A therapy failure. *J Neurol* 2003; 250: 967-969.
 59. Byrne M, Smith T, Montgomery V, Smith L. Purification, potency, and efficacy of the botulinum neurotoxin type A binding domain from *Pichia pastoris* as a recombinant vaccine candidate. *Infect Immun* 1998; 66(10): 4817-22.
 60. Ben D, Torgeman A, Barnea A, Zichel R. Expression, purification and characterization of the receptor-binding domain of botulinum neurotoxin serotype B as a vaccine candidate. *Protein Expr Purif* 2015 Jun; 110:122-9. doi: 10.1016/j.pep.2015.02.008.

Adres do korespondencji:

prof. dr hab. Maria Jastrzębska
Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej
i Medycyny Molekularnej
70-111 Szczecin, al. Powstańców Wlkp. 72
Tel. +48 91 4661509
e-mail: mariajas@pum.edu.pl

Zaakceptowano do druku: 16.04.2015