

Received: 11.04.2017
Accepted: 12.10.2017
Published: 16.04.2018

Toksyna botulinowa w medycynie i kosmetologii – dwustuletnia historia i nowe perspektywy

Botulinum toxin in medicine and cosmetology – two hundred years' history and new perspectives

Małgorzata Zbrojkiewicz, Agata Lebedowska, Barbara Błońska-Fajfrowska

Katedra i Zakład Podstawowych Nauk Biomedycznych, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny
Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Streszczenie

Od odkrycia toksyny botulinowej oraz szczepu *Clostridium botulinum* odpowiedzialnego za jej syntezę minęło prawie 200 lat. Wiedza na temat botulizmu oraz wykorzystanie toksyny w medycynie znacznie się rozszerzyła. Znanych jest osiem serotypów toksyny botulinowej (A-H), które różnią się między sobą: masą cząsteczkową (m.cz.), budową antygenową, immunogennością, receptorami oraz umiejscowieniem kodujących je genów i czasem utrzymania się działania terapeutycznego po ich zastosowaniu. Po raz pierwszy możliwość zastosowania toksyny botulinowej w celach medycznych wykazał amerykański lekarz Allan B. Scott. Obecnie w medycynie szeroko stosowana jest toksyna botulinowa typu A, a iniekcje z toksyny są nie tylko jednym z najbardziej popularnych niechirurgicznych zabiegów estetyczno-kosmetycznych, ale znalazły również zastosowanie w neurologii, okulistyce i dermatologii. Możliwości terapeutyczne toksyny botulinowej jeszcze się nie wyczerpały o czym świadczą licznie prowadzone badania kliniczne mające na celu poszerzenie wskazań terapeutycznych preparatów z toksyną botulinową oraz poprawę bezpieczeństwa ich stosowania. Dzięki ciągłemu rozwojowi medycyny toksyna botulinowa wykorzystywana do zabiegów estetycznych, poprawia wygląd zewnętrzny, a także jakość życia osób cierpiących na choroby z nadmierną kurczliwością mięśni i inne zaburzenia nerwowo-mięśniowe.

Słowa kluczowe:

toksyna botulinowa • botulizm • neurotoksyna • *Clostridium botulinum* • Botox® • białka SNARE

Summary

It has been nearly 200 years since the discovery of the botulinum toxin and the strain responsible for its synthesis *Clostridium botulinum*. Over this period, the knowledge about botulism and the use of botulinum toxin in medicine has been significantly expanded. Currently, eight serotypes of botulinum toxin (A-H) are known and they differ from each other by molecular weight, antigenic structure, immunogenicity, receptors, localization of coding genes and by the duration of the therapeutic effect. American physician Allan B. Scott was the first to demonstrate the use of botulinum toxin for medical purposes. Nowadays, botulinum toxin type A is widely used in medicine. Botulinum toxin injections are not only one of the most popular non-surgical aesthetic-cosmetic procedures, but are also widely used in neurology, ophthalmology and dermatology. The therapeutic potential of botulinum toxin has not been exhausted yet. Currently, many clinical trials are underway to extend the therapeutic indications of botulinum toxin and to improve its safety. Due to the huge development in medicine, botulinum toxin is today not only associated with aesthetic procedures and improvement in appearance, but also with raising the quality of life for people suffering from diseases with excessive muscle contraction and with other neuromuscular disorders.

Keywords:

botulinum toxin • botulism • neurotoxin • *Clostridium botulinum* • Botox® • SNARE proteins

GICID:	01.3001.0011.7617
DOI:	10.5604/01.3001.0011.7617
Word count:	6118
Tables:	2
Figures:	2
References:	97

Adres autorki: mgr farm. Małgorzata Zbrojkiewicz, Katedra i Zakład Podstawowych Nauk Biomedycznych, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Kasztanowa 3, 41-200 Sosnowiec; e-mail: mzbrojkiwicz@gmail.com

Toksyna botulinowa (BoNT) została odkryta w 1817 r. przez niemieckiego lekarza Justina Kernerera podczas oględzin ciała pacjenta, który zmarł w wyniku zatrucia po spożyciu spleśniałej kiełbasy. Na podstawie wielu przypadków klinicznych, z którymi zetknął się podczas praktyki lekarskiej, jako pierwszy opublikował pełny opis objawów zatrucia jadem kiełbasianym [29,51]. Kernererowi nie udało się jednak zidentyfikować patogenu, który odpowiadał za wytwarzanie toksyny wywołującej śmiertelny botulizm, natomiast toksynę nazwał „jadem kiełbasianym” odnosząc się pośrednio do źródła jej pochodzenia. Bakterię *Bacillus botulinus* oraz wytwarzaną przez nią toksynę po raz pierwszy wyizolował i nazwał w 1897 r. mikrobiolog Emil Pierre Marie van Ermengem. Obecnie szczep bakterii *Bacillus botulinus* znany jest pod nazwą systematyczną *Clostridium botulinum* [29,51]. Wiadomo, że botulizm, to poważna i często śmiertelna choroba objawiająca się silnym porażeniem autonomicznego układu nerwowego oraz mięśni, najczęściej po spożyciu zanieczyszczonych toksyną produktów spożywczych. Źródłem zakażenia bywają najczęściej przetwory spożywcze wytwarzane w warunkach domowych lub przeterminowana oraz niewłaściwie przechowywana żywność zakupiona w sklepie (konserwy mięsne, rybne i jarzynowe). Wprawdzie zatrucie jadem kiełbasianym następuje głównie drogą pokarmową, to może być również spowodowane infekcją *Clostridium botulinum* w jelitach noworodków (botulizm dziecięcy), zakażeniem ran (botulizm przyranny) lub w wyniku inhalacji toksyny przez drogi oddechowe. Początkowe objawy zatrucia: osłabienie ze zmęczeniem, zawroty głowy i suchość w ustach. pojawiają się po kilku godzinach od spożycia pokarmu zawierającego jad kiełbasiany. Dopiero po pewnym czasie pojawiają się objawy neurologiczne: podwójne widzenie, światłowstręt, zez zbieżny, opadanie powiek, niewyraźna mowa czy rozszerzenie źrenic [17,29,51].

Po raz pierwszy możliwość zastosowania toksyny botulinowej w celach medycznych wskazał amerykański lekarz okulista Allan B. Scott. W 1960 r. rozpoczął poszukiwania innej metody leczenia zez, alternatywnej od tradycyjnego zabiegu chirurgicznego. W 1978 r. otrzymał zgodę FDA (Food and Drug Administration) na przeprowadzenie badania pilotażowego i zastosowanie u ochotników toksyny botulinowej typu A w postaci iniekcji do nadpobudliwych mięśni ocznych, a w 1989 r. toksyna

botulinowa została zatwierdzona przez FDA do stosowania w celach terapeutycznych u ludzi [83,84,91]. Od pierwszej rejestracji toksyny botulinowej do leczenia zez, nastąpił dynamiczny rozwój badań zarówno przedklinicznych, jak i klinicznych nad jej wykorzystaniem w innych chorobach przebiegających z nadmierną kurczliwością mięśni (kurcz powiek, połowiczny kurcz twarzy, kręcz karku) [9,82]. Obecnie toksyna botulinowa jest wykorzystywana w wielu chorobach przebiegających z zaburzeniami nerwowo-mięśniowymi. Znalazła również zastosowanie w medycynie estetycznej.

BUDOWA MOLEKULARNA I STRUKTURA

Toksyna botulinowa jest jedną z najsilniejszych znanych toksyn pochodzenia naturalnego, a jej dawka letalna dla człowieka wynosi 0,2-2,0 µg/kg i zależy od ekspozycji [57]. Jest wytwarzana przez Gram-dodatnie laseczki jadu kiełbasianego *Clostridium botulinum*, w wyniku beztlenowej fermentacji. Szczep ten to bakterie beztlenowe, powszechnie występujące w zielonych częściach roślin, w glebie, w wodzie oraz w odchodach zwierzęcych [69]. Znanych jest osiem serotypów toksyny botulinowej (A-H), które różnią się masą cząsteczkową (m.cz.), budową antygenową i immunogennością, receptorami oraz umiejscowieniem kodujących je genów, a także czasem utrzymania się działania terapeutycznego po ich zastosowaniu [34,85]. Szczepy bakterii wytwarzające neurotoksyny botulinowe podzielono na 6 grup metabolicznych [12,86]. Do grupy I zalicza się proteolityczne szczepy *C. botulinum* wytwarzające toksyny BoNT/A, BoNT/B, BoNT/F, BoNT/H, grupa II to nieproteolityczne szczepy *C. botulinum* wytwarzające toksyny BoNT/E i BoNT/F, grupa III proteolityczne i nieproteolityczne szczepy *C. botulinum* wytwarzające BoNT/Cα, BoNT/Cβ oraz BoNT/D, grupa IV to nieproteolityczne i sacharolityczne szczepy *C. subterminale* i *C. hastiforme* wytwarzające toksynę BoNT/G. W związku z przypadkami botulizmu u niemowląt i izolacją szczepów *C. butyricum*, które wytwarzają toksynę BoNT/E oraz szczepów *C. baratii* wytwarzających toksynę BoNT/F zostały one zaliczone do grup V i VI. Ponadto, do każdej z grup metabolicznych z wyłączeniem II należy nietoksynogeny odpowiednik szczepu, który utracił zdolność wytwarzania toksyn. W grupie I takim odpowiednikiem są szczepy *C. sporogenes*, w grupie III szczepy *C. novyi*, a w grupie IV

szczyony *C. subterminale* i *C. histiforme* [3,5]. Uważa się, że toksyny botulinowe typu A, B i E są odpowiedzialne za zatrucia jadem kiełbasianym u ludzi, a za najbardziej toksyczny uważany jest typ A [69]. Natomiast toksyny BoNT/C oraz BoNT/D częściej są łączone z botulizmem zwierząt, a neurotoksyna BoNT/G, która jest izolowana wyłącznie z próbek ziemi, dotychczas ma nieudowodniony związek z botulizmem [3]. Toksyna BoNT/H jest pierwszym nowym typem toksyny botulinowej, który został rozpoznany w ciągu ostatnich 40 lat. Szczep *Clostridium botulinum* IBCA10-7060, zaliczany do szczepów proteolitycznych, odkryto u pacjenta z botulizmem dziecięcym [23,85]. Za pomocą testu neutralizacji miana antytoksyn botulinowych wykazano, iż szczep ten wytwarza nie tylko BoNT/B, ale również nieznan wcześniej typ toksyny, którą określono jako BoNT/H. Próbe neutralizacji nowej toksyny przeprowadzono za pomocą standardowych monowałentnych poliklonalnych mysich

antytoksyn botulinowych przeciwko BoNT/A-G. Dalsze badania wykazały, iż toksyna BoNT/H może być zneutralizowana tylko przez królicze antytoksyny botulinowe, jednak wymaga to dalszych badań [5,23,62]. Większość szczepów *Clostridium botulinum* jest zdolnych do wytwarzania jednego, określonego serotypu toksyny. Są jednak przypadki obecności genów kodujących dwa typy toksyny botulinowej u jednego szczepu bakterii (np. *Clostridium botulinum* IBCA10-7060). Wówczas jedna z toksyn jest wytwarzana w znacznie większej ilości, a geny odpowiedzialne za wytwarzanie drugiego typu toksyny ulegają ekspresji w niewielkim stopniu lub wcale [42].

W medycynie szerokie zastosowanie ma toksyna botulinowa typu A, która jest dużym białkiem o strukturze krystalicznej i m.c. 150 kDa. W skład neurotoksyny wchodzi zarówno toksyna jak i zestaw białek kompleksujących (neurotoxin associated proteins-NAPs). Rola białek kompleksu-

Tabela 1. Charakterystyka szczepów *Clostridium botulinum* oraz wytwarzanych przez nie serotypów toksyny botulinowej

Szczep <i>Clostridium botulinum</i> [31,41]	Toksyna botulinowa			Inne gatunki bakterii zdolne do syntezy toksyny [41]	
	Serotyp BoNT [31,41]	Gen kodujący BoNT	Substrat białkowy		Receptor białkowy
Hall 183 Hall 3676 Hall 3685a Prevot F5G Prevot 892	A	BotR/A bontA [32,63]	SNAP-25 [7]	SV2C>SV2A>SV2B, FGFR3 [55,61,97]	-
VPI 3,801 Prevot 1687 Prevot 1662 ATCC 8083	B	bontB [4]	VAMP-2/ synaptobrewina [76,80]	SytlI> Sytl [20,55]	-
Smith 6813 Smith 6814 Prevot 571Y Prevot 2233 Prevot 2266	C	bontC [52,74]	Syntaksyna [95]	? [55,88]	-
Schantz ATCC 11873 ATCC 2751	D	bontD [52,74]	VAMP-2/ synaptobrewina [78]	SV2B>SV2C>SV2A [55,71]	-
ATCC 17852 Alaska E43	E	bontE [93]	SNAP-25 [7]	SV2A>SV2B [21,55,60]	<i>Clostridium butyricum</i>
CDC 2821 Langeland 6/14 Eklund 202 Wall strain 8G	F	bontF [30]	VAMP-2 [81]	SV2 [35,55,72]	<i>Clostridium barati</i>
2738 1353 2740 2741	G		VAMP-2 [77]	Sytl – SytlI [20,55,73]	<i>Clostridium argentinense</i>
IBCA10-7060	H		VAMP-2/ synaptobrewina [31,41]	?	-

jących polega na ochronie neurotoksyny przed enzymami proteolitycznymi w przewodzie pokarmowym oraz niekorzystnym wpływem warunków środowiska. Neurotoksyna jest białkiem, które składa się z modułów oraz domen, a dzięki swoistej budowie ma wysoki potencjał i selektywność neuronową [53,65]. Laseczka jadu kiełbasianego (*Clostridium botulinum*) wytwarza toksynę botulinową w postaci pojedynczego nieaktywnego łańcucha polipeptydowego, składającego się z 1296 aminokwasów (aa), który po pocięciu przez tkankowe proteiny przekształca się w aktywną dwułańcuchową molekułę, zbudowaną z ciężkiego (448 aa, 100 kDa) oraz lekkiego (848 aa, 50 kDa) łańcucha. Łańcuchy są połączone pojedynczym wiązaniem dwusiarczkowym, a obecność tego wiązania jest niezbędna do wystąpienia aktywności neurotoksycznej [94].

Wszystkie serotypy neurotoksyny botulinowej (BoNTs) są wytwarzane w nieaktywnej i nietoksycznej postaci. Aktywne postaci toksyny powstają z kompleksu protoksyny, w wyniku działania proteaz wytwarzanych przez szczepy proteolityczne bakterii albo proteaz organizmu gospodarza [38]. Kompleks protoksyny botulinowej składa się z aktywnej toksyny (BoNT), z hemaglutyniny (HA) oraz nietoksycznej niehemaglutyniny (NTHN). Można wyróżnić trzy postaci protoksyn: M (m.c. około 300 kD, składającą się z BoNT oraz NTHN), L (masa około 500 kD, składającą się z BoNT, NTHN oraz dwóch HA) i LL (m.c. 900 kD, dimer składający się z dwóch protoksyn L) [38]. Aktywna BoNT składa się z dwóch łańcuchów, połączonych wiązaniem disiarczkowym [57,69]. N-końcówką część BoNT tworzy łańcuch lekki (LC) o masie cząsteczkowej około 50 kDa (448 aa) pełniący funkcję metaloproteiny cynkowej z charakterystycznym dla termolizyny motywem koordynującym atom cynku [26,79]. Część C-końcówką toksyny tworzy łańcuch ciężki (HC) o masie cząsteczkowej około 100 kDa (848 aa) składający się z dwóch funkcjonalnych domen - translokacyjnej domeny N-końcówki odpowiedzialnej za przemieszczenie łańcucha lekkiego przez błonę endosomalną oraz C-końcówki domeny wiążącej receptor [26]. Cała cząsteczka toksyny botulinowej składa się z trzech funkcjonalnych domen:

- metaloproteiny cynkowej zależnej (łańcuch lekki),
- domeny umożliwiającej transport cząsteczki toksyny przez błonę presynaptyczną oraz
- domeny wiążącej toksynę do receptora błony presynaptycznej [38].

Łańcuch lekki jest odpowiedzialny za degradację białka SNAP-25 (synaptosomal-associated protein of 25 kDa), należącego do białek SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor), następuje zahamowanie uwalniania neuroprzekazników do szczeliny synaptycznej połączeń nerwowo-mięśniowych - mięsień zostaje sparaliżowany [54,57].

MECHANIZM DZIAŁANIA

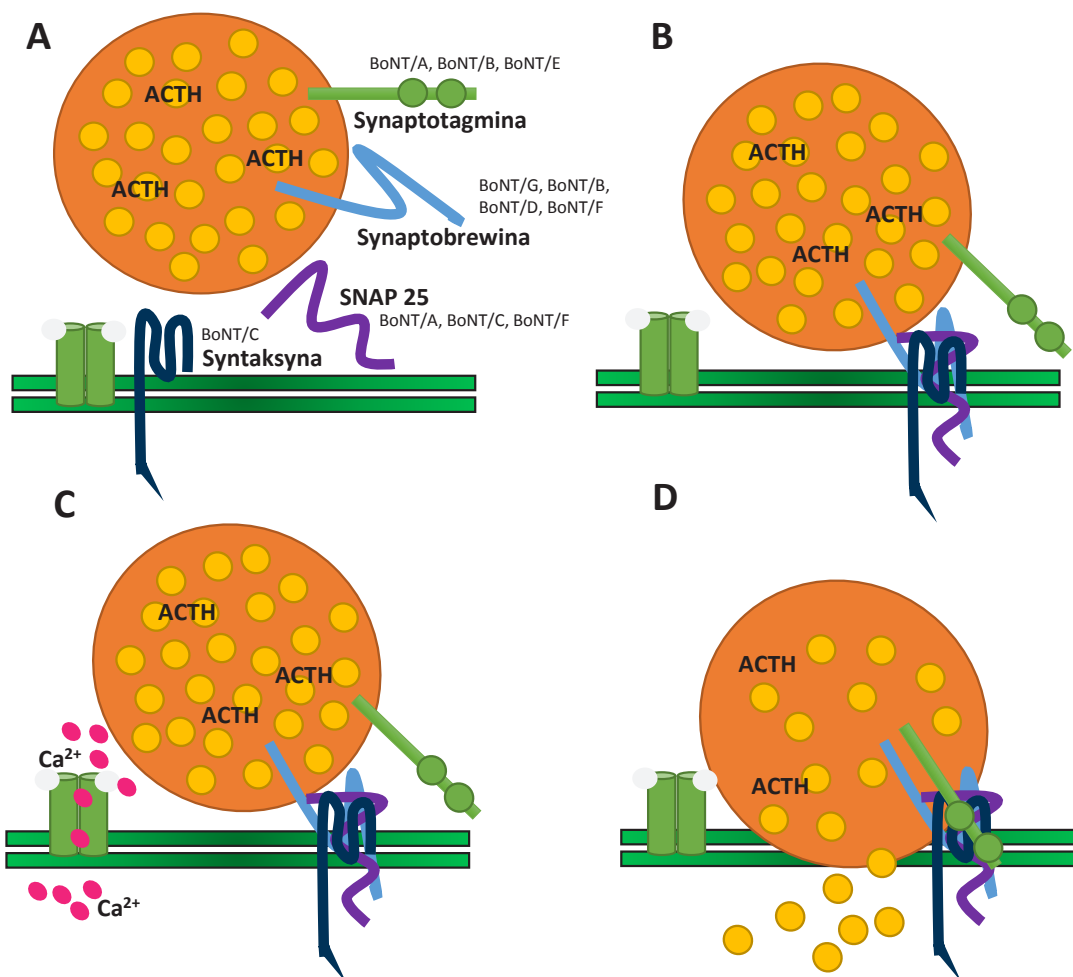
Po iniekcji toksyny botulinowej do docelowej tkanki, toksyna za pomocą ciężkiego łańcucha łączy się z zakoń-

zeniami presynaptycznymi cholinergicznymi włókien nerwowych w obrębie płytki motorycznej. Połączenie jest możliwe dzięki wysokiemu powinowactwu cząsteczek toksyny do receptorów, które znajdują się na powierzchni błony presynaptycznej. Każda toksyna zawiera swoisty receptor - toksyna botulinowa typu B wiąże się z synaptotagminą, a receptorem toksyny botulinowej typu A jest białko związane z błoną pęcherzyka presynaptycznego SV2C (synaptic vesicle glycoprotein 2C) (tab.1.) [64,82].

Toksyna botulinowa typu A może się związać z białkiem SV2C dopiero w chwili uwolnienia acetylocholiny z pęcherzyka do szczeliny synaptycznej. Wynika to z umiejscowienia receptora SV2C na wewnętrznej powierzchni błony pęcherzyka presynaptycznego. Proces wiązania się toksyny botulinowej typu A jest tym intensywniejszy, im większa liczba pęcherzyków uwalnia acetylocholinę. Zatem im aktywniejsza jest synapsa nerwowo-mięśniowa, tym proces wiązania toksyny jest bardziej nasilony. Po połączeniu się toksyny botulinowej z receptorem SV2C, ulega endocytozie. W wyniku interakcji hydrofobowych domen łańcucha ciężkiego toksyny z błoną endosomalną pęcherzyka, do cytosolu wnika lekki łańcuch, który ma właściwości enzymatyczne. Jego substratem jest obecne w cytoplazmie białko SNAP-25, będące częścią białkowego kompleksu SNARE, odpowiedzialne za transport i sekrecję pęcherzyków z acetylocholiną do przestrzeni synaptycznej [64,94]. Białka SNARE odpowiadają za transport pęcherzykowy oraz biorą udział w rozpoznawaniu i fuzji pęcherzyków z błoną komórkową. Wśród białek SNARE, oprócz białka związanego z synaptosomem, tj. SNAP-25, występuje jeszcze białko pęcherzyka synaptycznego - synaptobrewina oraz związana z błoną komórkową syntaksyna (ryc.1). Mechanizm działania toksyny botulinowej typu A jest związany z enzymatycznym uszkodzeniem białek kompleksu SNARE w błonie presynaptycznej zakończeń nerwowych. Za defragmentację białka SNAP-25 odpowiada lekki łańcuch toksyny botulinowej typu A [64,94]. Toksyna BoNT/A, hydrolizując białko SNAP-25, odcina dziewięć ostatnich aminokwasów i następuje zahamowanie uwalniania acetylocholiny z zakończeń presynaptycznych włókien nerwowych w obrębie OUN. Zablockowana jest funkcja motorycznej płytki nerwowo-mięśniowej, a mięśnie ulegają zwiotczeniu (ryc.2). Ponadto, można zaobserwować zmiany autonomicznego układu nerwowego: suchość błony śluzowej jamy ustnej i gardła, porażenie akomodacji oka, porażenie perystaltyki jelit, trudności w oddawaniu moczu lub zatrzymanie moczu oraz ortostatyczne spadki ciśnienia tętniczego krwi [9,64].

BIOTECHNOLOGICZNY PROCES WYTWARZANIA I REKONSTRUKCJI TOKSYNY BOTULINOWEJ

Gatunek *Clostridium botulinum* tworzą laseczki urzęsione, przetrwalnikujące, które występują pojedynczo, parami bądź tworzą łańcuszki. Dla wszystkich szczepów bakterii *Clostridium botulinum* optymalne pH wynosi 7,0-7,2 [87], a optymalna temperatura rozwoju laseczek jadu kiełbasianego waha się w zależności od szczepu i wynosi 30-40°C, przy temperaturze 4°C dochodzi do zahamo-



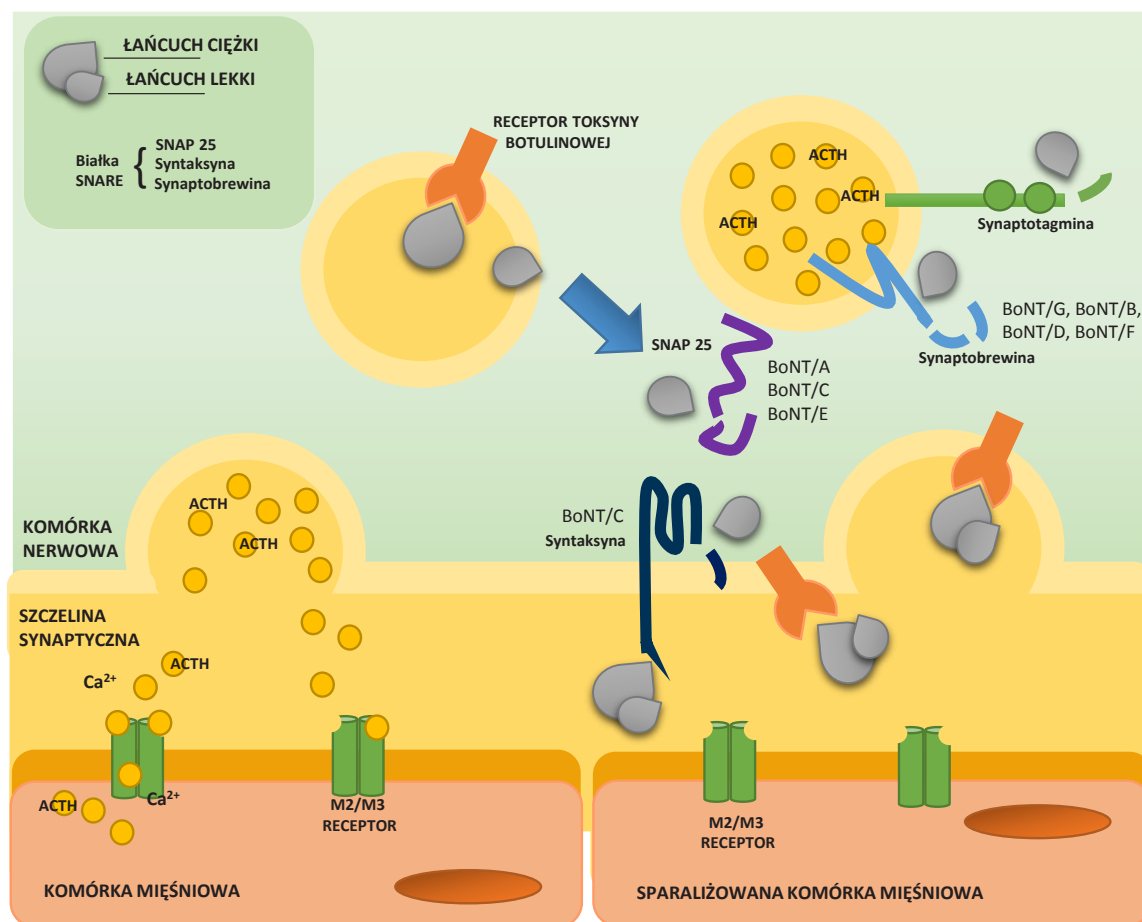
Ryc. 1. Transport pęcherzykowy z udziałem białek SNARE, A,B - kompleks białkowy składający się z białek SNARE (synaptobrewina, syntaksyna, synaptotagmina, SNAP-25), umożliwia zbliżenie się pęcherzyka synaptycznego do błony presynaptycznej. Każdy typ BoNT korzysta z innego akceptora, z którym nieodwracalnie wiąże się karboksylowy koniec jej łańcucha ciężkiego. Za pierwszy etap odpowiada gangliozyd umiejscowiony w błonie cholinergicznego zakończenia nerwowego, a w kolejnym główną rolę odgrywa białko swoiste dla danego typu serologicznego BoNT. W BoNT/B białkiem tym jest synaptotagmina I i II, a w BoNT/A jest to SV2C; C,D - łańcuchy lekkie wszystkich typów BoNT wykazują aktywność endopeptydaz zależnych od cynku. Ich substratami są białka uczestniczące w zapoczątkowanym przez depolaryzację błony presynaptycznej procesie uwalniania acetylocholino. Białka te należą do kompleksu SNARE i są niezbędne w procesie fuzji błony pęcherzyka synaptycznego z błoną presynaptyczną. Fuzja pęcherzyków z błoną powoduje uwolnienie acetylocholino do szczeliny synaptycznej oraz umożliwia wytworzenie i przekazanie impulsu nerwowego do mięśnia (wg [39,89] zmodyfikowano)

wania wzrostu. Szeroki zakres temperatury optymalnego wzrostu dla różnych szczepów powoduje trudności w doborze selektywnej pożywki hodowlanej [44,87]. Stosowanie pożywek zawierających produkty pochodzenia zwierzęcego wiąże się z ryzykiem zanieczyszczenia priornami, w związku z tym unika się stosowania do hodowli laseczek *C. botulinum* podłoży zawierających produkty odzwierzęce. Najczęściej media hodowlane bazują na produktach roślinnych, m.in. na hydrolizatach soi.

Gotowe preparaty lecznicze zawierające w składzie toksynę botulinową typu A to różne kompozycje neurotoksyny z białkami kompleksującymi, wskutek czego mają odmienne ciężary cząsteczkowe oraz struktury przestrzenne. Rodzaj otrzymanej neurotoksyny zależy od

metody wzrostu bakterii oraz wykorzystanej metody jej oczyszczania [34]. Ponadto, ostateczna kompozycja farmaceutyczna może zawierać również jedną lub więcej substancji pomocniczych, takich jak: bufor, nośnik, stabilizator, środek konserwujący i/lub środek zwiększający objętość. W celu otrzymania jak największej ilości aktywnej neurotoksyny, niezbędna jest optymalizacja warunków hodowli bakterii *C. botulinum*. Obecność nieaktywnych cząsteczek toksyny botulinowej w gotowym produkcie nie zwiększa jego skuteczności leczniczej, a zwiększa jego antygenowość [22].

Preparat leczniczy Botox® to sterylny liofilizat toksyny botulinowej typu A, którą pozyskuje się z hodowli *C. botulinum* typu A-Hall, przez precypitację toksyny za pomocą



Ryc. 2. Mechanizm działania toksyny botulinowej (wg [13,19,66] zmodyfikowano)

kwasu do krystalicznego kompleksu zawierającego toksynę i inne białka, stosuje się w tym celu kwas siarkowy (H_2SO_4) bądź kwas solny (HCl), a następnie do powstałego osadu dodawany jest odpowiedni bufor. Całość traktowana jest inhibitorem proteazy, najczęściej w postaci chlorowodoru benzamidyny, a jednocześnie do powstałej zawiesiny i osadu jest dodawana DNaza i RNaza. Całość ponownie jest traktowana kwasem, w celu wytrącenia toksyny i ułatwienia rozpuszczenia osadu w buforze, którym jest najczęściej bufor fosforanowy. Po serii wytrąceń toksyna botulinowa jest oczyszczana metodą chromatografii jonowymiennej, a najczęściej używanym anionem jest dietyloaminoetyl (DEAE). Zastosowanie tej metody umożliwia otrzymanie toksyny botulinowej o wysokim stopniu czystości [50,75]. Ze względów bezpieczeństwa, preparat Botox® powinien być podawany w ciągu czterech godzin po rozpuszczeniu i musi być przechowywany w temperaturze 2-8°C. Rozpuszczony preparat jest przezroczysty i bezbarwny [69].

IMMUNOGENNOŚĆ

Badania wykazały, iż preparaty zawierające różne typy BoNT/A (onabotulinumtoxin A, incobotulinumtoxin A,

abobotulinumtoxin A) są porównywalne pod względem skuteczności klinicznej, a różnice między nimi wynikają głównie z rodzaju tworzonego kompleksu neurotoksyny botulinowej, swoistej aktywności biologicznej oraz ich immunogenności [34]. W wyniku ekspozycji na neurotoksynę mogą formować się dwa typy przeciwciał: neutralizujące i nieneutralizujące. Przeciwciała nieneutralizujące nie wpływają na aktywność biologiczną neurotoksyny. Natomiast odpowiednie miano przeciwciał neutralizujących, przez hamowanie wiązania z receptorem, hamuje aktywność biologiczną toksyny [67,69]. Wielkość kompleksu białkowego oraz jego ciężar cząsteczkowy nie mają wpływu na aktywność biologiczną, stabilność, dystrybucję czy profil działań niepożądanych toksyny botulinowej. Ważne dla jej aktywności biologicznej są natomiast białka kompleksujące oraz nieaktywna toksyna botulinowa (toksoid), które przyczyniają się do stymulacji układu odpornościowego i wytwarzania przeciwciał neutralizujących. Zjawisko to nosi nazwę immunogenności, co oznacza zdolność substancji do wywołania przeciwko sobie swoistej odpowiedzi odpornościowej i powstawania przeciwciał. Wytworzone przeciwciała mają na celu neutralizację toksyny, a to może

zmniejszyć aktywność biologiczną preparatu leczniczego zawierającego toksynę i zakończyć się niepowodzeniem leczenia (antibody-induced therapy failure, ABTF). Immunogenność toksyny zależy od wielu czynników, które są związane z jej właściwościami lub stanem układu odpornościowego. Do czynników wpływających na immunogenność można zaliczyć czynniki związane z produktem, takie jak: proces wytwarzania, antygenowe obciążenie białkowe, obecność białek kompleksujących, a także czynniki związane z procesem leczenia, np.: dawka toksyny, przyjmowanie iniekcji przypominających (booster injections) i wcześniejsza ekspozycja na toksynę [34,82]. Zjawisko immunogenności może doprowadzić do powstawania różnic wyników terapeutycznych oraz spowodować niepowodzenie leczenia, które najczęściej ma związek z długotrwałym leczeniem chorób przewlekłych, wymagających częstych iniekcji toksyny botulinowej. Brak białek kompleksujących może w znaczący sposób poprawiać bezpieczeństwo stosowania toksyny przez zmniejszenie prawdopodobieństwa wywołania odpowiedzi immunologicznej [24,82]. W celu uniknięcia odpowiedzi immunologicznej zaleca się stosowanie najmniejszych możliwych dawek preparatu w dużych odstępach czasowych (nie częściej niż co 10-12 tygodni). Ponadto, do czynników ryzyka zwiększających prawdopodobieństwo wystąpienia zjawiska immunogenności zalicza się płeć żeńską oraz rodzaj ostrzykiwanej tkanki, natomiast łączna dawka, czas leczenia oraz wiek nie należą do czynników nasilających ryzyko wystąpienia ABTF [82].

BEZPIECZEŃSTWO

Należy podkreślić, iż stosowanie toksyny botulinowej jest skuteczne i bezpieczne jedynie wówczas, gdy jest podawana w odpowiednich dawkach przez wykwalifikowanego lekarza. Jak każdy lek, preparaty zawierające toksynę botulinową mogą powodować wystąpienie działań niepożądanych. Większość działań niepożądanych występuje w ciągu kilku pierwszych dni po podaniu toksyny i ma charakter przejściowy. W celu zapewnienia bezpieczeństwa w stosowaniu preparatów z toksyną botulinową oraz uzyskania jak najlepszych skutków terapeutycznych zanim lekarz podejmie decyzję o zmianie preparatu bądź terapii należy wykluczyć przyczyny braku działań terapeutycznych. Do najczęstszych przyczyn takiego stanu zalicza się błędy w przebiegu terapii związane z nieprawidłowym przechowywaniem czy przygotowaniem preparatu, zbyt wygórowane oczekiwane efekty końcowe, czy też czynniki psychologiczne. W takich przypadkach rekomenduje się dodatkowy cykl terapeutyczny z zastosowaniem takiej samej dawki, a zmiana preparatu leczniczego jest zalecana dopiero, jeśli brak działania terapeutycznego utrzymuje się nadal [90].

Ze względu na rodzaj działań niepożądanych można podzielić je na miejscowe i systemowe. Miejscowe działania niepożądane są związane z dyfuzją leku z miejsca podania do sąsiednich tkanek, co może wywołać dys-

fagię, osłabienie mięśni poprzecznie prążkowanych, diplopię, opadanie kącika ust lub głowy, ptozę oraz ból, stan zapalny, zaczerwienienie, obrzęk czy krwawienie w miejscu podania. Najczęściej miejscowym działaniem niepożądanym jest opadająca powieka po wstrzyknięciu preparatu z toksyną botulinową między brwiami pacjenta. Do powikłania dochodzi wówczas, gdy lek zostanie podany nieznacznie poniżej właściwego miejsca lub gdy jego dawka jest zbyt duża [2]. Systemowe efekty niepożądane stosowania toksyny botulinowej wynikają z jej ogólnoustrojowego działania. Wśród systemowych działań niepożądanych do najczęściej występujących zalicza się: dysfagię [2,82], zaburzenia oddychania oraz osłabienie mięśni [2,36,56]. Inne działania niepożądane związane z pracą obwodowego układu nerwowego [43] obejmują m.in.: dyzartrię [2], porażenie kończyn [18,82] i niewydolność oddechową [82]. Do objawów związanych z zaburzeniem funkcji autonomicznego układu nerwowego zaliczyć należy suchość jamy ustnej i gardła [17,51] porażenie akomodacji oka [2], podrażnienie rogówki [2], porażenie perystaltyki jelit, krwimocz i trudności z oddawaniem moczu [17,58] oraz ortostatyczne spadki ciśnienia tętniczego krwi. Spośród innych możliwych działań niepożądanych mogą wystąpić: zespół grypopodobny [18] oraz autoimmunologiczne: pleksopatia i poliradikuloneuropatia [70]. Pojawiły się również doniesienia o przypadkach dystonii mięśniowej, niewydolności nadnerczy [17,68] oraz stanach zapalnych naczyń i tkanki podskórnej [82]. Toksyna botulinowa może spowodować zmianę koloru skóry w miejscu wstrzyknięcia, zaostrzenie się łuszczycy oraz wywołać reakcję anafilaktyczną [65].

Preparaty z toksyną botulinową zawierają niewielką dawkę toksyny botulinowej, która podana miejscowo powinna działać jedynie w miejscu podania. Jednak Bomba-Warczak i wsp. [10] udowadniają, że toksyna botulinowa wędruje między neuronami, co sugeruje, że podana miejscowo może - przez sieć neuronalną - przenikać do ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Badanie przeprowadzono na mysich neuronach, które umieszczone były w specjalnych studzienkach hodowlanych, umożliwiających wzrost aksonów. W celu minimalizacji ryzyka odległych działań niepożądanych toksyny botulinowej, należy metodami inżynierii genetycznej stworzyć szczep bakterii wytwarzających toksynę niezdatną do wędrowki siecią komórek nerwowych [10].

ZASTOSOWANIE

Obecnie w celach terapeutycznych najczęściej stosuje się toksynę botulinową typu A i B (tab. 2). W Polsce są zarejestrowane trzy preparaty zawierające toksynę botulinową typu A: Botox® (onabotulinumtoxin A, ONA), Xeomin® (incobotulinumtoxin A, INCO) oraz Dysport® (abobotulinumtoxin A, ABO). Preparat leczniczy zawierający toksynę botulinową typu B jest obecnie zarejestrowany wyłącznie w Stanach Zjednoczonych pod nazwą handlową MYOBLIC®/NeuroBloc (rimabotulinumtoxin B) [94].

W ostatnim czasie można zaobserwować duży wzrost zainteresowania toksyną botulinową oraz stopniowe rozszerzanie wskazań do jej stosowania. Mimo iż zyskała międzynarodową sławę głównie dzięki przeciwmarszczkowemu działaniu i z tego powodu znalazła szerokie zastosowanie w medycynie estetycznej, zakres jej działania farmakologicznego i wskazań leczniczych ciągle się rozszerza. W 2002 r. FDA zaakceptowała zastosowanie toksyny botulinowej typu A do tymczasowej korekcji głębokich zmarszczek czoła. Początkowo, preparat Botox® firmy Allergan, był przeznaczony do korekcji zmarszczek mimicznych wyłącznie górnej części twarzy. Badania dowiodły dużą skuteczność i bezpieczeństwo zabiegów z zastosowaniem toksyny botulinowej w redukcji zmarszczek mimicznych. Efekt zabiegu pojawia się najczęściej 24-72 godzin po zabiegu i utrzymuje się 3-6 miesięcy. Najlepsze efekty osiągnęte są u pacjentów przed 50 rokiem życia [14]. Zwiększenie poziomu wiedzy i doświadczenie pozwoliły na rozszerzenie stosowania toksyny na dolną część twarzy, szyję oraz dekolt [96].

Preparat z toksyną botulinową jest wstrzykiwany w mięśnie docelowe z użyciem igły, a podawana dawka dobierana jest indywidualnie. Po zabiegu zalecany jest wypoczynek, przez co najmniej dwa dni nie należy wykonywać czynności wymagających dużego wysiłku, a przez dwa tygodnie nie wolno stosować zabiegów laserowych, zabiegów na twarz i masaży twarzy [69].

Toksyna botulinowa typu A jest obecnie szeroko stosowana m.in. w neurologii. Głównym wskazaniem do terapii toksyną botulinową jest leczenie nadreaktywności mięśni, które charakteryzuje się niezależnymi od woli, powtarzającymi się skurczami mięśni, zaburzającymi ruchy twarzy, szyi oraz całego ciała (dystonia). Toksyna botulinowa jest jednym z wielu leków stosowanych w spastyczności mięśni objawiającej się wzmożonym napięciem i/lub sztywnością mięśni. Najlepiej zbadanym wskazaniem terapeutycznego wykorzystania toksyny botulinowej A jest spastyczność mięśni. Dzięki mechanizmowi działania toksyna powoduje ogniskowe, selektywne i czasowe osłabienie wybranej grupy mię-

Tabela 2. Zastosowanie BoNT/A w medycynie w terapii pierwszego rzutu lub gdy konwencjonalne leczenie zawodzi

<p>Spastyczność mięśni</p> <p>Udar i udarowe uszkodzenie mózgu [82]</p> <p>Porażenie mózgowie [24]</p> <p>Stwardnienie rozsiane [82]</p> <p>Uraz rdzenia kręgowego [82]</p>	<p>Dystonia ogniskowa</p> <p>Dystonia szyjna (kręć karku, torticollis) [46,47]</p> <p>Dystonia krtaniowa [11,46]</p> <p>Dystonia ustno-żuchwowa [27]</p> <p>Połowiczy kurcz twarzy [46]</p>
<p>Dystonia mięśni</p> <p>Drżenie [28,46]</p> <p>Tiki nerwowe [46]</p> <p>Myokimie [47,82]</p> <p>Synkinezy [47,82]</p> <p>Drgawki kloniczne mięśni [28]</p> <p>Szum w uszach [82]</p> <p>Szczękocisk [82]</p> <p>Anismus - defekacja dysynergiczna [82]</p> <p>Bruksizm nocny [82]</p>	<p>Zez i zaburzenia widzenia</p> <p>Zez towarzyszący zbieżny, rozbieżny, wrodzony, ukryty, pooperacyjny [28,82]</p> <p>Błądzące sprzężone ruchy gałek ocznych [28,82]</p> <p>Oczopląs (<i>fac. nystagmus</i>) [28,47,82]</p> <p>Nadmierne łzawienie [82]</p> <p>Retrakcja powiek [28,82]</p> <p>Kurcz powiek (blefarospasm) [28,82]</p>
<p>Zaburzenia z nadmierną ruchliwością mięśni gładkich</p> <p>Dyssynergia wypieraczowo- zwieraczowa [1]</p> <p>Idiopatyczna nadreaktywność mięśnia wypieracza [24]</p> <p>Łagodny przerost prostaty [82]</p> <p>Achalazja przełyku [1]</p> <p>Pęcherz neurogeny [94]</p> <p>Dysfunkcja zwieracza Oddiego (DZO) [1]</p> <p>Objaw Raynauda (<i>fac. phenomenon Raynaud</i>) [82]</p> <p>Szczelina odbytu [1]</p>	<p>Przewlekły ból oraz miejscowe zaburzenia skurczu mięśni</p> <p>Napięciowe bóle głowy [28]</p> <p>Szyjnopochodny ból głowy (cervicogenic headache) [46]</p> <p>Przewlekłe bóle pleców [46]</p> <p>Przewlekłe bóle głowy i migreny [28]</p> <p>Dysfunkcja stawu skroniowo-żuchwowego (DSSŻ, zespół Costena) [33]</p> <p>Bóle neuropatyczne [46]</p>
<p>Zastosowanie kosmetyczne</p> <p>Platyzm – napięte pasma mięśnia szerokiego szyi [46]</p> <p>Hiperkinezy (ruchy mimowolne) mięśni twarzy [46]</p> <p>Zmarszczki gładziny czoła [24,28]</p> <p>Zmarszczki dolnych kątów oczu [24,28]</p> <p>Blokada głośni [11]</p>	<p>Pocenie się, ślinotok, alergia</p> <p>Nadmierna potliwość (<i>fac. hyperhidrosis</i>) ogniskowa: pach, dłoni, stóp, skóry głowy [24]</p> <p>Nadmierna potliwość uogólniona [28]</p> <p>Uszno-skroniowy Zespół Frey (Frey's syndrome) [82]</p>
	<p>Inne zastosowania</p> <p>Otyłość [1]</p> <p>Gastropareza [1]</p> <p>Zespoły parkinsonowskie [47]</p> <p>Mózgowe porażenie dziecięce [47]</p> <p>Bóle kostno-stawowe [94]</p>

śni. Jest podawana również pacjentom z problemem nietrzymania moczu związanego z nadreaktywnością mięśnia wypieracza pęcherza moczowego po urazach rdzenia kręgowego poniżej odcinka szyjnego, pacjentom ze stwardnieniem rozsianym oraz w nadmiernym poceniu się, ślinieniu i w migrenach [37,46,47]. W przeprowadzonych dotychczas badaniach klinicznych, w których testowana była skuteczność leczenia przewlekłych codziennych bólów głowy oraz chronicznej migreny wykazano umiarkowane korzyści wynikające z zastosowania BoNT/A, a terapia toksyną botulinową jest wskazana głównie u pacjentów z chronicznymi bólami głowy [15,16,92].

Głównymi przeciwwskazaniami do stosowania toksyny botulinowej są reakcje uczuleniowe na toksynę oraz zaburzenia nerwowo-mięśniowe, takie jak miastenia rzekomoporażna (myasthenia gravis) [25].

POCHODNE TOKSYNY BOTULINOWEJ I ICH ZASTOSOWANIE W MEDYCYNIE ESTETYCZNEJ

Jedną z najbardziej charakterystycznych oznak starzenia się skóry jest powstawanie zmarszczek. Z wiekiem skóra staje się bardziej sucha, cienka i ma zmniejszoną zdolność do naturalnej ochrony przed czynnikami zewnętrznymi. Powstawanie zmarszczek mimicznych jest wynikiem nadmiernej stymulacji włókien mięśniowych twarzy, przede wszystkim w okolicach oczu oraz w obrębie policzków i czoła [8,49]. Częściowy paraliż mięśni twarzy likwiduje istniejące zmarszczki i zapobiega powstawaniu nowych. Neurotoksyna botulinowa, zwłaszcza BoNT/A jest szeroko stosowana w celu złagodzenia objawów starzenia, jednak jej zastosowanie jest ograniczone ze względu na znaczną toksyczność [6,48,51].

Poszukiwane są ciągle cząsteczki naśladujące działanie BoNT/A. Syntetyczne peptydy, przypominające sekwencję aminokwasową białka SNAP-25, są swoistymi inhibitorami sekrecji neurotransmiterów do szczeliny synaptycznej [8,40]. Jednak wielkość cząsteczek peptydów i ich słaba przepuszczalność przez skórę, ogranicza w znacznej mierze ich zastosowanie w kosmetologii. Optymalne byłoby zastosowanie cząsteczek, które mają krótsze sekwencje aminokwasów, przy zachowaniu aktywności biologicznej, czego przykładem jest argirelina. Białko to jest heksapeptydem o budowie naśladującej N-końcową domenę białka SNAP-25. Argirelina przenika przez skórę, a zastosowana w postaci 10% emulsji powoduje zmniejszenie głębokości zmarszczek

w okolicach oczu. Badania wykazały, że argirelina jest dobrze tolerowana i może zastępować preparaty zawierające toksynę botulinową [8,48,49].

Inną substancją naśladującą działanie toksyny botulinowej jest Vialox[®], pentapeptyd pozyskiwany z jadu węża [59]. Jako antagonistą receptora acetylocholino (ACh), łączy się z nim, blokując dostęp cząsteczkom ACh. Następuje zmniejszenie częstości i siły skurczów mięśni. Częściowo sparaliżowane mięśnie ulegają rozluźnieniu i osiągnany jest efekt podobny do działania Botoxu[®]. Alternatywą dla toksyny botulinowej – o podobnym mechanizmie działania – jest Syn-Ake[®], czyli syntetyczny mimetyk, stworzony na podobieństwo węgleryny-1 występującej w jadzie żmii (*Tropidolaemus wagleri*) [59]. Syn-Ake[®] jest trójpeptydem będącym antagonistą receptora acetylocholino. Redukuje zmarszczki przez hamowanie skurczów mięśni. Obydwie substancje wchodziły w skład kremów, a ich stosowanie wiąże się z mniejszym dyskomfortem, bólem i ryzykiem niż stosowanie iniekcji z preparatów zawierających toksynę botulinową.

PODSUMOWANIE

Początkowo toksyna botulinowa kojarzona była wyłącznie z wystąpieniem śmiertelnego w skutkach botulizmu. Obecnie zatrucie jadem kiełbasianym występuje rzadko, a z toksyną spotykamy się w głównie w gabinetach medycyny estetycznej. Według statystyk opublikowanych przez Międzynarodowe Towarzystwo Estetycznej Chirurgii Plastycznej (International Society of Aesthetic Plastic Surgery, ISAPS), które jest uznawane za wiodącą organizację stowarzyszającą certyfikowanych chirurgów plastycznych, zastrzyki z neurotoksyny typu A (BoNT/A) są obecnie najbardziej popularnym i najszerzej stosowanym niechirurgicznym zabiegiem estetyczno-kosmetycznym na całym świecie [45]. Szeroki zakres działania toksyny wykorzystano również w neurologii, okulistyce i dermatologii. Wieloletnie doświadczenie kliniczne w stosowaniu BoNT sprawiło, iż jest względnie bezpieczna i skuteczna, pod warunkiem stosowania jej w odpowiednich dawkach przez wykwalifikowany personel. W dalszym ciągu prowadzone są liczne badania kliniczne mające na celu poszerzenie wskazań terapeutycznych preparatów z toksyną botulinową. Dzięki temu znacznie być kojarzona nie tylko z zabiegami estetycznymi i poprawą wyglądu zewnętrznego, ale również z poprawą jakości życia osób cierpiących na choroby z nadmierną kurczliwością mięśni i inne zaburzenia nerwowo-mięśniowe.

PISMIENNICTWO

[1] Albanese A., Bentivoglio A.R., Cassetta E., Viggiano A., Maria G., Gui D.: Review article: The use of botulinum toxin in the alimentary tract. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 1995; 9: 599-604

[2] Alcalay R.N., Simoes R.M., Feigin A.: Neuralgic amyotrophy following botulinum toxin injection. *Parkinsonism Relat. Disord.*, 2010; 16: 301-302

[3] Augustynowicz E., Gzyl A., Gniadek G., Ślusarczyk J.: Fenotyp i genotyp szczepów z rodzaju *Clostridium* wytwarzających neurotoksyny botulinowe. *Med. Dośw. Mikrobiol.*, 2003; 55: 245-252

[4] Bandyopadhyay S., Clark A.W., DasGupta B.R., Sathyamoorthy V.: Role of the heavy and light chains of botulinum neurotoxin in neuromuscular paralysis. *J. Biol. Chem.*, 1987; 262: 2660-2663

- [5] Barash J.R., Arnon S.S.: A novel strain of *Clostridium botulinum* that produces type B and type H botulinum toxins. *J. Infect. Dis.*, 2014; 209: 183-191
- [6] Baskaran P., Lehmann T.E., Topchiy E., Thirunavukkarasu N., Cai S., Singh B.R., Deshpande S., Thyagarajan B.: Effects of enzymatically inactive recombinant botulinum neurotoxin type A at the mouse neuromuscular junctions. *Toxicon*, 2013; 72: 71-80
- [7] Binz T., Blasi J., Yamasaki S., Baumeister A., Link E., Südhof T.C., Jahn R., Niemann H.: Proteolysis of SNAP-25 by types E and A botulinum neurotoxins. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 1617-1620
- [8] Blanes-Mira C., Clemente J., Jodas G., Gil A., Fernández-Ballester G., Ponsati B., Gutierrez L., Pérez-Payá E., Ferrer-Montiel A.: A synthetic hexapeptide (Argireline) with antiwrinkle activity. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 2002; 24: 303-310
- [9] Bogucki A.: Toksyna botulinowa – budowa, preparaty, mechanizm działania, zastosowania kliniczne. W: Spastyeczność, red.: J. Sławek. Via Medica, Gdańsk 2007, 112-117
- [10] Bomba-Warczak E., Vevea J.D., Brittain J.M., Figueroa-Bernier A., Tepp W.H., Johnson E.A., Yeh F.L., Chapman E.R.: Interneuronal transfer and distal action of tetanus toxin and botulinum neurotoxins A and D in central neurons. *Cell Rep.*, 2016; 16: 1974-1987
- [11] Brin M.F., Stewart C., Blitzer A., Diamond B.: Laryngeal botulinum toxin injections for disabling stuttering in adults. *Neurology*, 1994; 44: 2262-2266
- [12] Burke G.S.: Notes on *Bacillus botulinus*. *J. Bacteriol.*, 1919; 4: 555-570
- [13] Čapek P., Dickerson T.J.: Sensing the deadliest toxin. *Technologies for Botulinum neurotoxin detection*. *Toxins*, 2010; 2: 24-53
- [14] Carruthers J.A., Lowe N.J., Menter M.A., Gibson J., Nordquist M., Mordaunt J., Walker P., Eadie N., BOTOX Glabellar Lines I Study Group: A multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study of the efficacy and safety of botulinum toxin type A in the treatment of glabellar lines. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2002; 46: 840-849
- [15] Castrillo S.A., Morollón S.M., Simonet H.C., Fernández R.B., Cerdán S.D., Mendoza R.A., Rodríguez S.M., Taberner G.C., Guerrero B.P., Ferrero R.M., Duate G.L.: Experience with botulinum toxin in chronic migraine. *Neurologia*, 2016 (w druku)
- [16] Choi Y.J., Lee W.J., Lee H.J., Lee K.W., Kim H.J., Hu K.S.: Effective botulinum toxin injection guide for treatment of temporal headache. *Toxins*, 2016; 8: E265
- [17] Chudzicka A.: Intoxication of botulinum toxin. *Pol. Merkur. Lekarski*, 2015; 39: 153-156
- [18] Crouner B.E., Torres-Russotto D., Carter A.R., Racette B.A.: Systemic weakness after therapeutic injections of botulinum toxin A. A case series and review of the literature. *Clin. Neuropharmacol.*, 2010; 33: 243-247
- [19] Dickerson J.T., Janda K.D.: The use of small molecules to investigate molecular mechanisms and therapeutic targets for treatment of botulinum neurotoxin A intoxication. *ACS Chem. Biol.*, 2006; 1: 359-359
- [20] Dong M., Tepp W.H., Liu H., Johnson E.A., Chapman E.R.: Mechanism of botulinum neurotoxin B and G entry into hippocampal neurons. *J. Cell Biol.*, 2007; 179: 1511-1522
- [21] Dong M., Yeh F., Tepp W.H., Dean C., Johnson E.A., Janz R., Chapman E.R.: SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A. *Science*, 2006; 312: 592-596
- [22] Donovan S.: Animal product free media and processes for obtaining a botulinum toxin. U.S. Patent No. 7,148,041; 2006. <https://docs.google.com/viewer?url=patentimages.storage.googleapis.com/pdfs/US7147148.pdf> (20.09.2016)
- [23] Dover N., Barash J.R., Hill K.K., Xie G., Arnon S.S.: Molecular characterization of a novel botulinum neurotoxin type H gene. *J. Infect. Dis.*, 2014; 209: 192-202
- [24] Dressler D.: Clinical applications of botulinum toxin. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2012; 15: 325-336
- [25] Dressler D.: Subclinical myasthenia gravis causing increased sensitivity to botulinum toxin therapy. *J. Neural Transm.*, 2010; 117: 1293-1294
- [26] Dressler D., Eleopra R.: Clinical use of non-A botulinum toxins. Botulinum toxin type B. *Neurotox. Res.*, 2006; 9: 121-125
- [27] Drożdżyńska M., Sobieraj-Garbiak I., Chlasta A., Jastrzębska M.: Toksyna botulinowa i jej zastosowanie w medycynie. *Diagn. Lab.*, 2015; 51: 139-146
- [28] Dutton J.J., Fowler A.M.: Botulinum toxin in ophthalmology. *Surv. Ophthalmol.*, 2007; 52: 13-31
- [29] Erbguth F.J.: 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-S6
- [30] Fach P., Micheau P., Mazuet C., Perelle S., Popoff M.: Development of real-time PCR tests for detecting botulinum neurotoxins A, B, E, F producing *Clostridium botulinum*, *Clostridium baratii* and *Clostridium butyricum*. *J. Appl. Microbiol.*, 2009; 107: 465-473
- [31] Fan Y., Barash J.R., Lou J., Conrad F., Marks J.D., Arnon S.S.: Immunological characterization and neutralizing ability of monoclonal antibodies directed against botulinum neurotoxin type H. *J. Infect. Dis.*, 2016; 213: 1606-1614
- [32] Franciosa G., Floridi F., Maugliani A., Aureli P.: Differentiation of the gene clusters encoding botulinum neurotoxin type A complexes in *Clostridium botulinum* type A, Ab, and A(B) strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004; 70: 7192-7199
- [33] Freund B., Schwartz M., Symington J.M.: Botulinum toxin. New treatment for temporomandibular disorders. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 2000; 38: 466-471
- [34] Frevert J.: Pharmaceutical, biological, and clinical properties of botulinum neurotoxin type A products. *Drugs R D*, 2015; 15: 1-9
- [35] Fu Z., Chen C., Barbieri J.T., Kim J.J., Baldwin M.R.: Glycosylated SV2 and gangliosides as dual receptors for botulinum neurotoxin serotype F. *Biochemistry*, 2009; 48: 5631-5641
- [36] Girlanda P., Vita G., Nicolosi C., Milone S., Messina C.: Botulinum toxin therapy: distant effects on neuromuscular transmission and autonomic nervous system. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 1992; 55: 844-845
- [37] Godoy I.R., Donahue D.M., Torriani M.: Botulinum toxin injections in musculoskeletal disorders. *Semin. Musculoskelet. Radiol.*, 2016; 20: 441-452
- [38] Grenda T., Kwiatek K.: *Clostridium botulinum* - charakterystyka i znaczenie epidemiologiczne. *Med. Weter.*, 2009; 65: 743-746
- [39] Gundelfinger E.D., Kessels M.M., Qualmann B.: Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2003; 4: 127-139
- [40] Gutiérrez L.M., Cànaves J.M., Ferrer-Montiel A.V., Reig J.A., Montal M., Vinięgra S.: A peptide that mimics the carboxy-terminal domain of SNAP-25 blocks Ca²⁺-dependent exocytosis in chromaffin cells. *FEBS Lett.*, 1995; 372: 39-43
- [41] Hatheway C.L.: Botulism. The present status of the disease. W: *Clostridial Neurotoxins*, red.: Montecucco C., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1995; 195: 55-75
- [42] Hatheway C.L.: Toxigenic *Clostridia*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1990; 3: 66-98
- [43] Hill K.K., Smith T.J., Helma C.H., Ticknor L.O., Foley B.T., Svensson R.T., Brown J.L., Johnson E.A., Smith L.A., Okinaka R.T., Jackson P.J., Marks J.D.: Genetic diversity among botulinum neurotoxin producing *Clostridial* strains. *J. Bacteriol.*, 2007; 189: 818-832
- [44] Ilkhchouy Y., Ghaly R.F., Knezevic N.N., Candido K.D.: Central ner-

- vous system toxicity after botulinum neurotoxin injection. *Anesth. Pain Med.*, 2013; 3: 223-225
- [45] International Society of Aesthetic Plastic Surgery. Press Release - ISAPS Statistics 2016. <http://www.isaps.org/news/isaps-global-statistics> (15.10.2016)
- [46] Jabbari B.: History of botulinum toxin treatment in movement disorders. *Tremor Other Hyperkinet. Mov.*, 2016; 6: 394
- [47] Jost W.H., Benecke R., Hauschke D., Jankovic J., Kaňovský P., Roggenkämper P., Simpson D.M., Comella C.L.: Clinical and pharmacological properties of incobotulinumtoxinA and its use in neurological disorders. *Drug Des. Devel. Ther.*, 2015; 9: 1913-1926
- [48] Jung C.H., Yang Y.S., Kim J.S., Shin J.I., Jin Y.S., Shin J.Y., Lee J.H., Chung K.M., Hwang J.S., Oh J.M., Shin Y.K., Kweon D.H.: A search for synthetic peptides that inhibit soluble N-ethylmaleimide sensitive-factor attachment receptor-mediated membrane fusion. *FEBS J.*, 2008; 275: 3051-3063
- [49] Kang A., Shults A., Zhao Y.: Argireline decreases EPSP amplitude over time, and increases paired-pulse facilitation in a dose-dependent manner. *Pioneering Neurosci.*, 2015; 15: 17-23
- [50] Kim C.S., Song K.Y., Min K.M., An Y.D.: Method for production of botulinum toxin. U.S. Patent No. 9,512,418; 2016. <https://www.google.com/patents/US9512418?cl=en> (25.09.2016)
- [51] Kopera D.: Botulinum toxin historical aspects: from food poisoning to pharmaceutical. *Int. J. Dermatol.*, 2011; 50: 976-980
- [52] Kukier E., Kwiatek K., Grenda T., Goldsztejn M., Dębski J.: Botulizm - patogeneza i diagnostyka choroby. *Życie Wet.*, 2015; 90: 163-166
- [53] Kukreja R.V., Singh B.R.: Comparative role of neurotoxin-associated proteins in the structural stability and endopeptidase activity of botulinum neurotoxin complex types A and E. *Biochemistry*, 2007; 46: 14316-14324
- [54] Kumaran D., Adler M., Levit M., Krebs M., Sweeney R., Swaminathan S.: Interactions of a potent cyclic peptide inhibitor with the light chain of botulinum neurotoxin A: Insights from X-ray crystallography. *Bioorg. Med. Chem.*, 2015; 23: 7264-7273
- [55] Lam K. H., Yao G., Jin R.: Diverse binding modes, same goal: The receptor recognition mechanism of botulinum neurotoxin. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 2015; 117: 225-231
- [56] Lange D.J., Brin M.F., Warner C.L., Fahn S., Lovelace R.E.: Distant effects of local injection of botulinum toxin. *Muscle Nerve*, 1987; 10: 552-555
- [57] Liu X., Wang Y., Chen P., Wang Y., Zhang J., Aili D., Liedberg B.: Biofunctionalized gold nanoparticles for colorimetric sensing of botulinum neurotoxin A light chain. *Anal. Chem.*, 2014; 86: 2345-2352
- [58] Lo T.C., Yeung S.T., Lee S., Chang E.Y.: Hematuria following Botox treatment for upper limb spasticity: a case report. *J. Pain Res.*, 2015; 8: 619-622
- [59] Lupo M.P., Cole A.L.: Cosmeceutical peptides. *Dermatol. Ther.*, 2007; 20: 343-349
- [60] Mahrhold S., Rummel A., Bigalke H., Davletov B., Binz T.: The synaptic vesicle protein 2C mediates the uptake of botulinum neurotoxin A into phrenic nerves. *FEBS Lett.*, 2006; 580: 2011-2014
- [61] Mahrhold S., Strotmeier J., Garcia-Rodriguez C., Lou J., Marks J.D., Rummel A., Binz T.: Identification of the SV2 protein receptor-binding site of botulinum neurotoxin type E. *Biochem. J.*, 2013; 453: 37-47
- [62] Maslanka S.E., Lúquez C., Dykes J.K., Tepp W.H., Pier C.L., Pellett S., Raphael B.H., Kalb S.R., Barr J.R., Rao A., Johnson E.A.: A novel botulinum neurotoxin, previously reported as serotype H, has a hybrid-like structure with regions of similarity to the structures of serotypes A and F and is neutralized with serotype A antitoxin. *J. Infect. Dis.*, 2016; 213: 379-385
- [63] Mazurkiewicz-Pisarek A., Płucieniczak A.: Toksyna botulinowa - cudowna trucizna. *Biotechnologia*, 2009; 2: 123-133
- [64] Mirska A., Kułak W.: Terapia spasty czności toksyną botulinową w mózgowym porażeniu dziecięcym. *Neurol. Dziec.*, 2009; 18: 59-63
- [65] Namazi N., Robati R.M., Dadkhahfar S., Shafiee A., Bidari-Zerehpoush F.: Vasculitis with panniculitis following botulinum toxin A injection for cosmetic use. *Dermatol. Pract. Concept.*, 2016; 6: 19-21
- [66] Nassri A., Ramzan Z.: Pharmacotherapy for the management of achalasia: Current status, challenges and future directions. *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.*, 2015; 6: 145-155
- [67] Naumann M., Boo L.M., Ackerman A.H., Gallagher C.J.: Immunogenicity of botulinum toxins. *J. Neural Transm.*, 2013; 120: 275-290
- [68] Nayak P., O'Donnell B.: Central adrenal insufficiency post botox injection. <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/endo-meetings.2016.AHPAA.5.FRI-458> (04.09.2017)
- [69] Nigam P.K., Nigam A.: Botulinum toxin. *Indian J. Dermatol.*, 2010; 55: 8-14
- [70] Onoue H., Matsunobu A., Nagaiishi A., Yukitake M., Kuroda Y.: A case report of acute polyradiculoneuritis developing after multiple injections of botulinum toxin for cervical dystonia. *Rinsho Shinkeigaku*, 2004; 44: 20-24
- [71] Peng L., Tepp W.H., Johnson E.A., Dong M.: Botulinum neurotoxin D uses synaptic vesicle protein SV2 and gangliosides as receptors. *PLoS Pathog.*, 2011; 7: e1002008
- [72] Rummel A., Häfner K., Mahrhold S., Darashchonak N., Holt M., Jahn R., Beermann S., Karnath T., Bigalke H., Binz T.: Botulinum neurotoxins C, E and F bind gangliosides via a conserved binding site prior to stimulation-dependent uptake with botulinum neurotoxin F utilising the three isoforms of SV2 as second receptor. *J. Neurochem.*, 2009; 110: 1942-1954
- [73] Rummel A., Karnath T., Henke T., Bigalke H., Binz T.: Synaptotagmins I and II act as nerve cell receptors for botulinum neurotoxin G. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 30865-30870
- [74] Saeed E.M.: Studies on isolation and identification of *Clostridium botulinum* investigating field samples specially from equine grass sickness cases. PhD dissertation, Faculty of Agriculture, Goettingen University, 2004
- [75] Schantz E.J., Johnson E.A.: Preparation and characterization of botulinum toxin type A for human treatment. W: *Therapy with Botulinum Toxin*, red.: J. Jankovic, M. Hallet. Marcel Dekker, New York 1994, 41-50
- [76] Schiavo G., Benfenati F., Poulain B., Rossetto O., de Lauro P.P., DasGupta B.R., Montecucco C.: Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature*, 1992; 359: 832-835
- [77] Schiavo G., Malizio C., Trimble W.S., de Lauro P.P., Milan G., Sugiyama H., Johnson E.A., Montecucco C.: Botulinum G neurotoxin cleaves VAMP/synaptobrevin at a single Ala-Ala peptide bond. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 20213-20216
- [78] Schiavo G., Rossetto O., Catsicas S., de Lauro P.P., DasGupta B.R., Benfenati F., Montecucco C.: Identification of the nerve terminal targets of botulinum neurotoxin serotypes A, D, and E. *J. Biol. Chem.*, 1993; 268: 23784-23787
- [79] Schiavo G., Rossetto O., Santucci A., DasGupta B.R., Montecucco C.: Botulinum neurotoxins are zinc proteins. *J. Biol. Chem.*, 1992; 267: 23479-23483
- [80] Schiavo G., Shone C.C., Bennett M.K., Scheller R.H., Montecucco C.: Botulinum neurotoxin type C cleaves a single Lys-Ala bond within the carboxyl-terminal region of syntaxins. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 10566-10570
- [81] Schiavo G., Shone C.C., Rossetto O., Alexander F.C., Montecucco

- C.: Botulinum neurotoxin serotype F is a zinc endopeptidase specific for VAMP/synaptobrevin. *J. Biol. Chem.*, 1993; 268: 11516-11519
- [82] Schinwelski M., Sławek J.: Toksyna botulinowa w neurologii. *Neurol. Dydł.*, 2013; 8: 7-18
- [83] Scott A.B.: Botulinum toxin injection of eye muscles to correct strabismus. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.*, 1981; 79: 734-770
- [84] Scott A.B.: Botulinum toxin injection into extraocular muscles as an alternative to strabismus surgery. *Ophthalmology*, 1980; 87: 1044-1049
- [85] Simpson L.: The life history of a botulinum toxin molecule. *Toxicon*, 2013; 68: 40-59
- [86] Smith L.D.: *Clostridium tetani*. W: *The Pathogenic Anaerobic Bacteria*, 2nd ed., red.: Charles C., Thomas Publisher, 1975, 177-201
- [87] Sperber W.H.: Requirements of *Clostridium botulinum* for growth and toxin production. *Food Technol.*, 1982; 36: 89-94
- [88] Strotmeier J., Gu S., Jutzi S., Mahrhold S., Zhou J., Pich A., Eichner T., Bigalke H., Rummel A., Jin R., Binz T.: The biological activity of botulinum neurotoxin type C is dependent upon novel types of ganglioside binding sites. *Mol. Microbiol.*, 2011; 81: 143-156
- [89] Südhof T.C.: A molecular machine for neurotransmitter release: synaptotagmin and beyond. *Nat. Med.*, 2013; 19: 1227-1231
- [90] Truong D., Hallett M.: *Pharmacology of botulinum neurotoxins*. W: *Manual of Botulinum Toxin Therapy*, 2nd ed., red.: D. Truong, D. Dressler, M. Hallett, C. Zachary. Cambridge University Press, 2014: 12-15
- [91] United States Department of Health and Human Services. Re: Docket No. FDA-2008 P-0061. Food and Drug Administration. www.fda.gov/downloads/drugs/drugsafety/postmarketdrugsafetyinformationforpatientsandproviders/drugsafetyinformationforhealthcareprofessionals/ucm143989.pdf (11.07.2017)
- [92] Vikelis M., Argyriou A.A., Dermitzakis E.V., Spingos K.C., Mitsikostas D.D.: Onabotulinumtoxin-A treatment in Greek patients with chronic migraine. *J. Headache Pain*, 2016; 17: 84
- [93] Wang X., Maegawa T., Karasawa T., Kozaki S., Tsukamoto K., Gyobu Y., Yamakawa K., Oguma K., Sakaguchi Y., Nakamura S.: Genetic analysis of type E botulinum toxin-producing *Clostridium butyricum* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000; 66: 4992-4997
- [94] Wheeler A., Smith H.S.: Botulinum toxins. Mechanisms of action, antinociception and clinical applications. *Toxicology*, 2013; 306: 124-146
- [95] Williamson L.C., Halpern J.L., Montecucco C., Brown J.E., Neale E.A.: 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
- [96] Wu D.C., Fabi S.G., Goldman M.P.: Neurotoxins. Current concepts in cosmetic use on the face and neck-lower face. *Plast. Reconstr. Surg.*, 2015; 136 (Suppl. 5): 76S-79S
- [97] Yao G., Zhang S., Mahrhold S., Lam K.H., Stern D., Bagramyan K., Perry K., Kalkum M., Rummel A., Dong M., Jin R.: N-linked glycosylation of SV2 is required for binding and uptake of botulinum neurotoxin A. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2016; 23: 656-662

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.