

БОТУЛИНОВ НЕВРОТОКСИН – БИОХИМИЧНИ АСПЕКТИ И МЕХАНИЗЪМ НА ДЕЙСТВИЕ (ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР)

Нели Ерменлиева¹, Татина Тодорова¹, Габриела Цанкова¹, Емилия Георгиева², Мария Велкова³, Мария Ростамлоо³, Дияна Николова³, Даяна Цанкова⁴

¹Катедра „Предклинични и клинични науки“, Медицински университет - Варна

²УНС „Медицински лаборант“, Медицински колеж – Варна

³Студент, специалност „Медицински лаборант“, Медицински колеж – Варна

⁴Студент, специалност „Дентална медицина“, Медицински университет - Варна

BOTULINUM NEUROTOXIN – BIOCHEMICAL ASPECTS AND MECHANISM OF ACTION (REVIEW)

Neli Ermenlieva¹, Tatina Todorova¹, Gabriela Tsankova¹, Emiliya Georgieva², Mariya Velkova³, Mariya Rostamloo³, Dilyana Nikolova³, Dayana Tsankova⁴

¹Department of Preclinical and Clinical Sciences, Faculty of Medicine, Medical University of Varna

²TRS Medical Laboratory Assistant, Medical college, Medical University of Varna

³Student, TRS Medical Laboratory Assistant, Medical College, Medical University of Varna

⁴Student, Faculty of Dental Medicine, Medical University of Varna

РЕЗЮМЕ

Ботулиновият невротоксин (BoNT) е една от най-силните биологични субстанции, познати на човечеството. Произвежда се от спорообразуващи анаеробни бактерии *Clostridium botulinum*, които причиняват заболяването ботулизъм.

BoNT блокира освобождаването на невротрансмитера ацетилхолин, провеждащ нервните импулси до мускулните влакна. По този начин токсинът косвено предизвиква мускулна парализа. Тази негова животозастрашаваща способност обаче се оказва изключително ефективна при терапия на редица заболявания, свързани с абнормна хиперактивация на мускули и жлези, естетически корекции на глаберални бръчки и други.

Известни са девет серотипа на BoNT, наименовани с латинските букви от А-Н (BoNT-C е разделен на два типа), като типовете А, В, Е и F причиняват ботулизъм при човека. Според някои автори са изследвани и изолати от хора, съдържащи BoNT-G.

Изследват се и редица нови направления в медицинската практика, където BoNT може да се приложи ефективно - детска церебрална парализа, хронични анални фисури, урологични смущения и други.

ABSTRACT

Botulinum neurotoxin (BoNT) is one of the most poisonous biological substances known to mankind. The toxin is produced by spore-forming anaerobic bacteria *Clostridium botulinum*, which causes botulism.

BoNT blocks acetylcholine release – the principal neurotransmitter of the nerve impulses to muscle fibers. This indirectly causes muscle paralysis. This life-threatening ability, however, turns out to be extremely effective in the therapy of a number of diseases associated with hyperactivation of the muscles and glands, aesthetic corrections of glabellar wrinkles and others.

There are nine serotypes of BoNT, named with the Latin letters from A to H (BoNT-C is separated into two types), as types A, B, E and F cause botulism in humans. According to some authors there are human isolates containing BoNT-G too.

A number of new directions in the medical practice – cerebral palsy, chronic anal fissures, urological disorders and others – are currently under study for successful application of BoNT.

Keywords: Botulinum neurotoxin, botulism, *Clostridium botulinum*

Ключови думи: ботулинов невротоксин, ботулизъм, *Clostridium botulinum*

ВЪВЕДЕНИЕ

Ботулиновият невротоксин (BoNT) е най-силният биологичен токсин, познат на човечеството. Продуцира се от спорообразуващи анаеробни бактерии *Clostridium botulinum*, които причиняват заболяването ботулизъм. При видовете *C. butyricum* и *C. baratii* също е доказана продукцията на BoNT, съответно типове Е (5) и F (17).

BoNT блокира освобождаването на невротрансмитера ацетилхолин, провеждащ нервните импулси до мускулните влакна. По този начин токсинът косвено предизвиква мускулна парализа.

В началото на 70-те години на XIX в. BoNT за пръв път е приложен на човек след откритието, че той успешно може да се използва в терапията на широк спектър от заболявания, свързани главно с неволни и неконтролируеми мускулни контракции, хиперактивност на жлези и др. Оттогава с всяка изминала година интересът към него се засилва, приложението му в медицинската практика се разширява с бързи темпове, а в козметиката той се превърна в една от най-желаните естетически корекции за потребителите в целия свят.

Днес токсинът се използва широко в медицината и козметиката – от изглаждане на бръчки до терапия на страбизъм, хиперхидроза, мигрена, хронична болка, болест на Паркинсон, множествена склероза и много други.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на разработката е да се представи обща характеристика на ботулиновия невротоксин. За осъществяване на целта са разгледани биохимичната му структура, механизъм на действие спрямо засегнатата клетка, както и типове му разновидности в природата.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Използван е документален метод, като е осъществена справка с близо четиридесет научни публикации от медицински издания от различни части на Европа, Северна Америка и други.

Clostridium botulinum и ботулизъм

Род *Clostridium* са грам-положителни пръчковидни бактерии. Формата на клетката се асоции-

ра с „ракета за тенис“, придобита от деформиращата я спора (Фигура 1).



Фигура 1. Сканирана електронна микрограма на *Clostridium botulinum* (30)

Местообитанията на клостридиите най-често са чревният тракт на животни, почва и тиня, от където могат да попаднат върху зеленчуци, плодове, риба и др.

Ботулизъмът е *токсикоинфекция*, която настъпва след консумация на храна, съдържаща ботулинов екзотоксин, при размножаване на *C. botulinum* в рани или при бебета, погълнали спори на *C. botulinum* с контаминирана кърма, подсладена с мед вода и др.

Трите основни форми на заболяването са:

- ботулизъм, пренесен с храна,
- ранев ботулизъм,
- ботулизъм при кърмачета.

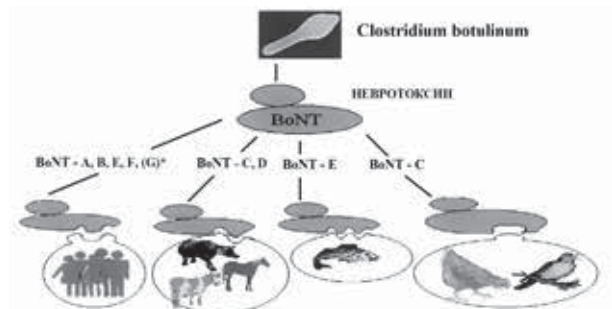
Днес се срещат и други форми на ботулизъм като ятрогенна – предизвикана от прекомерна терапевтична употреба на BoNT продукти (33) и ботулизъм, предизвикан от умишлено заразени продукти, с цел биотероризъм (4).

BoNT е мощен невротоксин. Симптоматиката на заболяването е изключително тежка, изразяваща се в *болки в корема, главоболие, повръщане*. В по-късен етап се наблюдават *парализа на очните мускули* (птоза на клепачите, нарушения в акомодацията), *затруднения в гълтането, говора, дишането става учестено и повърхностно*. Смъртта може да настъпи вследствие *парализа на дишането или спиране на сърдечната дейност* (1). За последните 50 години коефициентът на смъртни случаи след отравяне с BoNT е намалял с около 60% - от 75% на 15.5% (9). При бебетата ботулизъмът се счита за една от причините за

настъпване на *синдрома на внезапната бебешка смърт*. VoNT влиза в арсенала на бактериологичното оръжие.

СТРУКТУРА

Познати са девет серотипа на VoNT, наименовани с латинските букви от А-Н (Н е новооткрит (7)). Серотип С в последствие е разделен на два типа – С1 и С2 (32). Тип А се отличава като най-могъщ, следван от типовете В и F. Типове А, В и Е са най-честите причинители на ботулизъм при човека (11, 26), F и G се изолират рядко (Фигура 2).

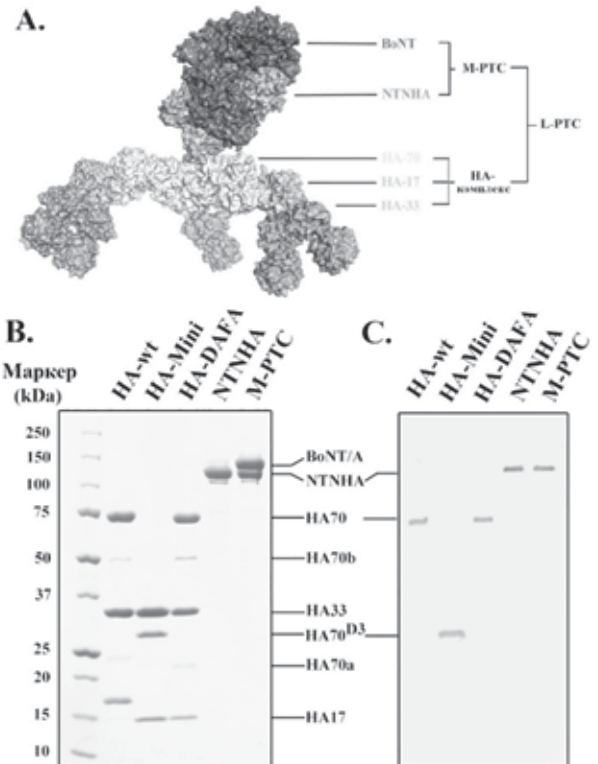


Фигура 2. Серотипове А, В, Е (25) и F (данните за G са спорни) причиняват ботулизъм при човека, серотипове С и D – при селскостопански и диви животни, Е - при риби (25)

VoNT-G антигенно значително се отличава от останалите типове, по тази причина продуцираният го вид е отделен като *Clostridium argentiense* (35, 38). Редица автори излагат твърдението, че не са потвърдени случаи на човешки или животински ботулизъм с VoNT-G (12), но още в 1981 г. Sonnabend O et al (1981) (34) съобщава за пет изолата, съдържащи VoNT – четири от аутопсен материал на възрастни и един от бебе на 18-седмична възраст.

До неотдавна определянето на типа на VoNT чрез биоанализ в мишка се е считало за „златен стандарт“, но днес гените, кодиращи типовете А, В, Е и F, могат лесно да бъдат разграничени посредством количествен PCR (28).

VoNT е невротоксичен протеин, чиято полипептидна верига се състои от лека верига ($\approx 50\text{kDa}$), свързана с молекула Zn^{2+} в N-края си (10, 15, 26) и тежка верига ($\approx 100\text{kDa}$). Между двете вериги има дисулфидна връзка (8, 26). Общата молекулна маса на невротоксичния компонент е 150 kDa. В комплекс с веригата са свързани и редица други нетоксични протеини - NAPs (non-toxic neurotoxin-associated proteins), по този начин VoNT и NAPs заедно формират т.нар. го-



Фигура 3. (А) Структура на голям прогениторен токсичен комплекс - L-PTC (Large-progenitor toxin complex) на ботулинов токсин тип А (20)

лям прогениторен токсичен комплекс – L-PTC (Large-progenitor toxin complex) (37).

NAPs включват три хемаглутинаращи протеини HA (hemagglutinin proteins) - HA-33, HA-17 и HA-70 (наричани още съответно HA1, HA2 и HA3 (37)), с вариращи молекулни маси и протеин, непритежаващ хемаглутинараща активност NTNHA (non-toxic non-hemagglutinin protein), с приблизителна молекулна маса 140 kDa (15, 26, 31). Целият мултипротеинов комплекс е с молекулна маса 500-900 kDa (15) (Фигура 3).

(B) Електрофореза (SDS-PAGE), показваща чистотата на различни рекомбинантни PTC компоненти. Малка част от HA70 спонтанно се е разпаднала на два пептида (HA70a и HA70b) (20); HA70 и HA17 в HA-wt комплексът имат неизрязани His-tags.

(C) Western blot с anti-мус антитела потвърждава целостта на мус-tag на HA70 (линии 1, 3), HA70D3 (линия 2) и NTNHA (линии 4, 5) (37).

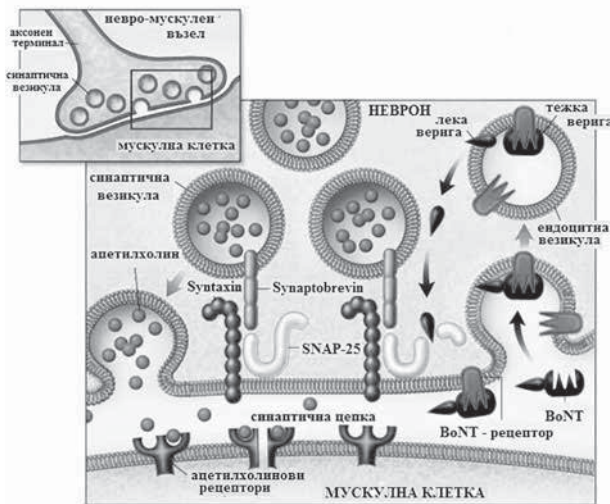
NTNHA е директно свързан с VoNT и има важна роля в защитата на токсина в неблагоприятна среда и неговото транспортиране, както и във взаимодействието с чревните епителни клетки (13, 14, 15, 27). Протеините HA съставляват до 60% от молекулното тегло на VoNT комплекс, но до момента тяхната роля в патогенезата на VoNT не е напълно изяснена (3, 15, 18, 19, 23, 24). По дан-



Фигура 4. Структура на BoNT (схематична диаграма) (10)

ни на Yao G et al (2014) една от функциите на HA-комплекса е да спомогне закрепването на BoNT за чревния епител, свързвайки се специфично с въглехидратни компоненти (37). Някои серотипове, като BoNT-E и BoNT-F, не разполагат с HA компонент, съответно и с гените, които ги кодират, но съдържат гени с неизвестна функция (orfX) (37).

BoNT се синтезира първоначално като едноверижна молекула, която в кисела среда е стабилна. При попадане в неутрално рН в макроорганизма молекулата се разцепва, формира се двойноверижна молекула със съхранен дисулфиден мост между леката (L) и тежката (H) компонента (Фигура 4).



Фигура 5. Механизъм на действие на BoNT (вдясно), сравнен с предаван нервен импулс в норма (вляво) (16)

Тежката верига осигурява холинергичната специфичност и е отговорна за свързването на токсина към пресинаптичните рецептори. Леката верига в N-терминалния си край демонстрира протеолитична активност (10).

МЕХАНИЗЪМ НА ДЕЙСТВИЕ

В осъществяване на мускулното съкращение основна роля играе ацетилхолинът, който представлява невротрансмитер в невромускулната връзка. В норма съкращението на мускула се осъществява, след като импулсът се придвижи в нервната клетка до нейния край, с помощта на ацетилхолина. Оттам последният преминава в междуклетъчното пространство, достига ацетилхолиновите рецептори на мускулната клетка и чрез предадения импулс мускулът се съкращава (Фигура 5).

Попадайки в среда с неутрално рН, молекулата на BoNT се разделя на лека и тежка верига и той преминава в активна форма (10). Тежката (H) верига на токсина се свързва необратимо и избирателно с рецептори на пресинаптичната повърхност на холинергичните неврони и комплексът токсин-рецептор предизвиква ендоцитоза. Дисулфидната връзка между двете вериги се разкъсва и токсинът се освобождава в цитоплазмата. Леката (L) верига взаимодейства с „разцепващите протеини“ (BoNT-A със SNAP 25; BoNT-B със Synaptobrevin) в нервните окончания и ги разрушава, като по този начин се предотвратява освобождаването на ацетилхолиновите везикули от клетъчната мембрана. В резултат, предаването на нервния импулс се блокира и мускулите се парализират. Пикът на парализиращия ефект настъпва след два до седем дни от началото на процеса (6, 26, 29). Парализата е обратима и временна – постепенно нервът се възстановява. Засегнатите нервни терминали обаче не се възстановяват. Функциите се нормализират чрез формиране на нови нервни окончания и синаптични контакти, което обикновено отнема два до три месеца (26).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

След над 25 години активно приложение в терапевтичната практика BoNT продължава да е едно от откритията, което не спира да буди интерес. Приложението му за медицински и естетически цели се разширява и усъвършенства с всяка изминала година. Към 2016 г. активно се проучва в световен мащаб степента на ефективност на токсина при терапия на детска церебрална парализа (21, 36) като алтернатива на сфинктеротомия при пациенти с хронични анални фисури (2), урологични смущения (22) и много други заболявания в човешката патологията.

ЛИТЕРАТУРА

1. Митов, Г., Цанев, Н., Дочева, Ю., Аврамова, Р., Митов, Ив. Микробиология. София, Арсо, 2000.
2. Abbas K, Ahmad M. Patient factors do not predict symptomatic response to botulinum toxin for the treatment of anal fissure. *Int Surg J.* 2016; 3(2):484-487
3. Arndt J, Gu J, Jaroszewski L, Schwarzenbacher R, Hanson M, Lebeda F, Stevens R. The structure of the neurotoxin-associated protein HA33/A from *Clostridium botulinum* suggests a reoccurring beta-trefoil fold in the progenitor toxin complex. *J Mol Biol.* 2005;346:1083–1093
4. Arnon S, Schechter R, Inglesby T, Henderson D et al. Botulinum Toxin as a Biological Weapon. *Medical and Public Health Management. JAMA.* 2001;285(8):1059-1070
5. Aureli P, Fenicia L, Pasolini B, Gianfrancesche, M, McCroskey J, Hatheway C. Two cases of type E infant botulism caused by neurotoxicogenic *Clostridium botulinum* in Italy. *J. Infect. Dis.* 1986;154(2):207–211
6. Awan K. The therapeutic usage of botulinum toxin (Botox) in non-cosmetic head and neck conditions – An evidence based review. *Saudi Pharmaceutical Journal.* Available online 30 April 2016
7. Barash J, Arnon S. A Novel Strain of *Clostridium botulinum* That Produces Type B and Type H Botulinum Toxins. *J Infect Dis.* 2013;209(2):183-191
8. Brin M. Botulinum toxin: Chemistry, pharmacology, toxicity, and immunology. *Muscle Nerve Suppl.* 1997;20:146-68
9. Centers for Disease Control and Prevention, Disease Listing, Botulism Manual, Additional Information – CDC Bacterial, Mycotic Diseases. Retrieved August 14, 2007.
10. Divakara K. Botulinum Toxin. *MedScape,* Feb 07, 2014, <http://emedicine.medscape.com/article/325451-overview>
11. Ellenhorn M, Barceloux D. Diagnosis and Treatment of Human Poisoning. *Medical Toxicology.* 1998; 1185-1187
12. Franciosa G, Pourshaban M, Luca A, Buccino A, Dallapiccola B, Aureli P. Identification of Type A, B, E, and F Botulinum Neurotoxin Genes and of Botulinum Neurotoxicogenic Clostridia by Denaturing High-Performance Liquid Chromatography. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(7):4170–4176.
13. Fujinaga Y, Inoue K, Watanabe S, Yokota K, Hirai Y, Nagamachi E, Oguma K. The haemagglutinin of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin plays an essential role in binding of toxin to the epithelial cells of guinea pig small intestine, leading to the efficient absorption of the toxin. *Microbiology.* 1997;143(12):3841–3847
14. Fujinaga Y, Inoue K, Watarai S, Sakaguchi Y, Arimitsu H, Lee JC et al. Molecular characterization of binding subcomponents of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin for intestinal epithelial cells and erythrocytes. *Microbiology.* 2004;150:1529–1538
15. Gu S, Jin R. Assembly and Function of the Botulinum Neurotoxin Progenitor Complex. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;364:21-44
16. Hallett M. One Man’s Poison — Clinical Applications of Botulinum Toxin, *N Engl J Med.* 1999;341:118-120
17. Hall J, McCroskey L, Pincomb B, Hatheway C. Isolation of an organism resembling *Clostridium baratii* which produces a type F botulinum toxin from an infant with botulism. *J. Clin. Microbiol.* 1985;21(4):654–655
18. Hasegawa K, Watanabe T, Suzuki T, Yamano A, Oikawa T, Sato Y et al. A novel subunit structure of *Clostridium botulinum* serotype D toxin complex with three extended arms. *J Biol Chem.* 2007;282:24777–24783
19. Inoue K, Fujinaga Y, Watanabe T, Ohyama T, Takeshi K, Moriishi K et al. Molecular composition of *Clostridium botulinum* type A progenitor toxins. *Infect Immun.* 1996;64:1589–1594
20. Lee K, Gu S, Jin L, Le T, Cheng L, Strotmeier J et al. Structure of a bimodular botulinum neurotoxin complex provides insights into its oral toxicity. *PLoS Pathog.* 2013, 9, e1003690
21. Lorin K, Forsberg A. Treatment with botulinum toxin in children with cerebral palsy: a qualitative study of parents’

- experiences. *Child: Care, Health and Development*, Version of Record online: 19 May 2016
22. Moore D, Cohn J, Dmochowski R. Use of Botulinum Toxin A in the Treatment of Lower Urinary Tract Disorders: A Review of the Literature. *Toxins*. 2016;8(4),88
 23. Nakamura T, Tonozuka T, Ide A, Yuzawa T, Oguma K, Nishikawa A. Sugar-binding sites of the HA1 subcomponent of Clostridium botulinum type C progenitor toxin. *J Mol Biol*. 2008;376:854–867
 24. National Botulinum Research Center, Botulinum Toxins: the Good, Bad, and the Ugly, February 2009, <http://earthzine.org/2009/02/10/botulinum-toxins-the-good-bad-and-the-ugly/>
 25. Nakamura T, Kotani M, Tonozuka T, Ide A, Oguma K, Nishikawa A. Crystal structure of the HA3 subcomponent of Clostridium botulinum type C progenitor toxin. *J Mol Biol*. 2009;385:1193–1206
 26. Nigam P, Nigam A. Botulinum toxin. *Indian J Dermatol*. 2010;55(1):8–14
 27. Niwa K, Koyama K, Inoue S, Suzuki T, Hasegawa K, Watanabe T et al. Role of nontoxic components of serotype D botulinum toxin complex in permeation through a Caco-2 cell monolayer, a model for intestinal epithelium. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007;49:346–352
 28. Satterfield B, Stewart A, Lew C, Pickett D, Cohen M, Moore E et al. A quadruplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of the Clostridium botulinum toxin genes A, B, E and F. *J Med Microbiol*. 2010;59(1):55–64
 29. Schantz E, Johnson E. Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 1992;56(1):80-99
 30. Science Photo Library, Science Image, <https://www.pinterest.com/pin/363525001143091344/>
 31. Sellin L. The pharmacological mechanism of botulism. *Trends Pharmacol Sci*. 1985;6:80-82
 32. Simpson L. Molecular Pharmacology of Botulinum Toxin and Tetanus Toxin. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 1986;26:427-453
 33. Sobel J. Botulism. *Clin Infect Dis*. 2005;41(8):1167-1173.
 34. Sonnabend O, Sonnabend W, Heinzle R, Sigrist T, Dirndorfer R, Krech U. Isolation of Clostridium botulinum type G and identification of type G botulinum toxin in humans: report of five unexpected deaths. *J. Infect. Dis*. 1981;143:22–27
 35. Suen J, Hatheway C, Steigerwalt A, Brenner D. Clostridium argentiense sp. nov.: a genetically homogeneous group composed of all strains of Clostridium botulinum toxin type G and some nontoxicogenic strains previously identified as Clostridium subterminale or Clostridium hastiforme. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 1988;38:375–381.
 36. Tilton A, Dabrowski E, Matthews D, Gormley M, Carranza J, Volteau M et al. Quantitative Effects of Botulinum Toxin Treatment on the Modified Ashworth Scale and the Tardieu Scale: Results from a Randomized Controlled Study of AbobotulinumtoxinA in Children with Dynamic Equinus Foot Deformity due to Cerebral Palsy. *Neurology*. 2016;86(16):Supplement I15.003
 37. Yao G, Lee K, Gu S, Lam K, Jin R. Botulinum Neurotoxin A Complex Recognizes Host Carbohydrates through Its Hemagglutinin Component. *Toxins*. 2014;6(2):624-635
 38. Zhou Y, Sugiyama H, Nakano H, Johnson E. The Genes for the Clostridium botulinum Type G Toxin Complex Are on a Plasmid. *Infection and Immunity*. 1995; 2087–2091