

# Botulinum toksin tip A - farmakološka svojstva i terapijska primjena

---

Radoš Filipović, Martina

Professional thesis / Završni specijalistički

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:107433>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET**

**Martina Radoš Filipović**

**BOTULINUM TOKSIN TIP A – FARMAKOLOŠKA SVOJSTVA I**  
**TERAPIJSKA PRIMJENA**

**Specijalistički rad**

**Zagreb, 2019.**

PSS studij: Razvoj lijekova

Mentor rada: Izv.prof.dr.sc. Lidija Bach-Rojecky

Specijalistički rad obranjen je dana 12.11.2019. na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof.dr.sc. Melita Šalković-Petrišić  
Sveučilište u Zagrebu  
Medicinski fakultet
2. Izv.prof.dr.sc. Lidija Bach-Rojecky  
Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
3. Prof.dr.sc. Jelena Filipović-Grčić  
Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Rad ima 80 listova.

## **Predgovor**

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za farmakologiju pod mentorstvom izv.prof.dr.sc. Lidije Bach-Rojecky. Predan je na ocjenu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu.

*Zahvaljujem svojoj mentorici, izv.prof.dr.sc. Lidiji Bach-Rojecky na ukazanom povjerenju i pomoći tijekom izrade specijalističkog rada. Također zahvaljujem svojoj obitelji, koja je uvijek uz mene.*

*Ovaj rad posvećujem svojoj mami Ruži.*

## **Sažetak**

### ***Cilj istraživanja***

Cilj ovog rada je dati detaljan uvid u najnovija saznanja o farmakološkim svojstvima botulinum toksina tipa A (BoNT-A) te dati kratak povijesni pregled od otkrića molekule toksina do prve primjene lijeka u kliničkoj praksi. Posebno će se opisati trenutno registrirani pripravci BoNT-A na globalnom tržištu, njihove sličnosti i razlike s obzirom na formulaciju, indikacije i ostale karakteristike bitne za kliničku primjenu.

### ***Materijali i metode***

Za potrebe ovog specijalističkog rada pretraživana je relevantna znanstvena i stručna literatura, znanstvene publikacije, baza lijekova Agencije za lijekove i medicinske proizvode Republike Hrvatske, mrežne stranice Europske agencije za lijekove, te Američke agencije za hranu i lijekove.

Bibliografske baze podataka pretraživane su prema ključnim riječima: *botulinum toxin type A, Botox, Dysport, Xeomin, indications, mechanism of action, side-effects, dosing, clinical effect, clinical trials, disease.*

### ***Rezultati***

*Clostridium botulinum* je gram pozitivna anaerobna sporogena bakterija s jedinstvenim svojstvom proizvodnje botulinum neurotoksina, od kojih je danas opisano 7 podtipova (A-G). Biološki aktivni dio molekule BoNT tipa A čini polipeptidni lanac od ~150 kDa koji se sastoji od lakog lanca (L lanac; 50 kDa) i teškog lanca (H lanac; 100 kDa). L i H lanac se drže zajedno dugačkim peptidnim pojasom i jednom disulfidnom vezom. Dvije poddomene H lanca omogućuju specifično vezanje za živčane završetke te endocitozu neurotoksina, pri čemu uslijed kiselog pH u endosomu dolazi do pucanja disulfidne veze i translokacije kratkog lanca toksina u citosol. L lanac je o  $Zn^{2+}$  ovisna proteaza koja specifično cijepa SNAP-25, jedan od proteina ključih za proces lučenja neurotransmitora iz živčanih okončina. Visoka

selektivnost za kolinergične neurone dovodi do inhibicije lučenja acetilkolina i mišićne paralize te disfunkcije autonomnih sinapsi, simptoma karakterističnih za botulizam. Međutim, pikogramske količine BoNT-A injicirane izravno u mišić ili u dermis terapijski se koriste kod različitih stanja karakteriziranih hiperkontraktilnošću mišića te autonomnih poremećaja. Do sada postoje tri registrirana pripravka BoNT-A na tržištu Europske unije: Botox<sup>®</sup>, Dysport<sup>®</sup> i Xeomin<sup>®</sup>. U ovom radu su uspoređene njihove sličnosti i razlike, od procesa proizvodnje, doziranja, do odobrenih indikacija.

### ***Zaključak***

Temelj farmakološkog djelovanja BoNT-A je inhibicija lučenja neurotransmitora iz perifernih kolinergičnih, ali i senzornih okončina. BoNT-A je potentan i neurospecifičan, ima ograničen stupanj difuzije nakon lokalne primjene te je njegovo djelovanje reverzibilno. Usprkos određenim nedostacima u razumijevanju mehanizma djelovanja i farmakokinetike toksina nakon lokalne primjene, pripravci BoNT-A se široko koriste u različitim indikacijama, a primjenu karakterizira dugo djelovanje nakon jednokratne primjene te dobra podnošljivost. Primjena BoNT-A do sada je odobrena kod 11 indikacija, dok se *off-label* primjenjuje u više od 20 indikacija.

## **Summary**

### ***Objectives***

The objective of this paper is to give insights into the latest knowledge about pharmacological characteristics of botulinum toxin type A (BoNT-A) and give a brief historical overview of the discovery the toxin molecule until the first application of the drug in clinical practice. The currently registered BoNT-A preparations in the global market, their similarities and differences in terms of formulation, indications and other characteristics relevant to clinical application will be described in particular.

### ***Material and methods***

For the needs of this paper relevant scientific and professional literature, scientific publications, medicine database of the Agency for Medicinal Products and Medical Products of the Republic of Croatia, the web pages of the European Medicines Agency, and the American Food and Drug Agency were searched.

Bibliographic databases are searched by keywords: *botulinum toxin type A, Botox, Dysport, Xeomin, indications, mechanism of action, side-effects, dosing, clinical effect, clinical trials, disease.*

### ***Results***

*Clostridium botulinum* is a genus of sporulating and anaerobic Gram-positive, rod-shaped bacteria with unique properties of botulinum neurotoxin production of which 7 subtypes (A-G) are now described. The biologically active part of the BoNT type A molecule comprises a polypeptide chain of ~ 150 kDa consisting of a light chain (L chain, 50 kDa) and a heavy chain (H chain, 100 kDa). L and H chain are held together by a long peptide belt and one disulfide bond. Two subdomains of the H chain provide specific binding to the nerve endings and endocytosis of the neurotoxin, whereby due to the acidic pH in the endosome disulfide linkage and the short chain toxin translocation into the cytosol occur. L chain is a Zn<sup>2+</sup>

dependent protease that specifically cleaves SNAP-25, one of the key proteins for the process of secrete neurotransmitters from the nerve endings. High selectivity for cholinergic neurons leads to inhibition of the secretion of acetylcholine and muscle paralysis, and dysfunction of autonomic synapses, symptoms typical of botulism. However, the picogram amounts of BoNT-A injected directly into the muscle or dermis are therapeutically used in various conditions characterized by muscular hypercontractility and autonomic disorders. So far, there are three registered BoNT-A preparations in the EU market: Botox<sup>®</sup>, Dysport<sup>®</sup> and Xeomin<sup>®</sup>. In this paper, their differences are compared, from the production process, the difference in doses, to the approved indications.

### ***Conclusion***

The basis of the pharmacological action of BoNT-A is the inhibition of neurotransmitter secretion from the peripheral cholinergic, but also the sensory endings. BoNT-A is potent and neurospecific, has a limited degree of diffusion after local application, and its action is reversible. Despite certain deficiencies in understanding the mechanism of action and the pharmacokinetic properties of the toxins in the body, BoNT-A preparations are widely used in various indications, and the administration is characterized by long acting after single use and good tolerance. The use of BoNT-A has so far been approved in 11 indications, while off-label is applied in more than 20 indications.



## SADRŽAJ

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 1.       | UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA .....                           | 1  |
| 1.1.     | Botulinum toksini .....  | 3  |
| 1.1.1.   | Clostridium botulinum i klasifikacija botulinskih neurotoksina ..... | 3  |
| 1.1.2.   | Povijesni pregled .....  | 8  |
| 1.1.3.   | Botulizam .....  | 12 |
| 1.1.3.1. | Trovanje hranom .....  | 15 |
| 1.1.3.2. | Botulizam putem rane .....   | 17 |
| 1.1.3.3. | Novorođenački botulizam .....  | 17 |
| 2.       | CILJ ISTRAŽIVANJA .....  | 18 |
| 3.       | MATERIJAL I METODE .....   | 19 |
| 3.1.     | Farmakološke karakteristike BoNT-A .....                             | 19 |
| 3.1.1.   | Struktura BoNT-A .....   | 19 |
| 3.1.2.   | Farmakokinetika BoNT .....   | 21 |
| 3.1.3.   | Mehanizam djelovanja BoNT .....                                      | 24 |
| 3.1.3.1. | Dvostruko vezanje za receptore .....                                 | 24 |
| 3.1.3.2. | Ulazak u živčane završetke .....                                     | 26 |
| 3.1.3.3. | Otpuštanje u citosol .....   | 27 |
| 3.1.3.4. | Translokacija unutar membrane sinaptičkih vezikula .....             | 27 |
| 3.1.4.   | Trajanje djelovanja .....  | 30 |
| 3.1.5.   | Mogući dodatni učinci BoNT-A .....                                   | 31 |
| 3.2.     | Formulacije BoNT-A na tržištu .....                                  | 32 |
| 3.3.     | Usporedba BoNT-A .....   | 37 |
| 3.3.2.   | Molekularna masa i kompleksni proteini .....                         | 39 |
| 3.3.3.   | Proces proizvodnje i rekonstitucije .....                            | 39 |
| 3.3.4.   | Stabilnost .....   | 40 |
| 3.3.5.   | Širenje i difuzija toksina .....                                     | 41 |
| 3.3.6.   | Imunogenost .....  | 42 |
| 3.4.     | Klinička usporedba tri pripravka botulinum toksina tipa A .....      | 44 |
| 3.4.1.   | Onabotulinum toksin (Botox <sup>®</sup> ) .....                      | 44 |
| 3.4.1.1. | Terapijske indikacije i doziranje .....                              | 44 |
| 3.4.1.2. | Nuspojave (vrlo česte i česte) .....                                 | 47 |
| 3.4.2.   | Abobotulinum toksin (Dysport <sup>®</sup> ) .....                    | 49 |
| 3.4.2.1. | Terapijske indikacije i doziranje .....                              | 50 |
| 3.4.2.1. | Nuspojave (vrlo česte i česte) .....                                 | 53 |
| 3.4.3.   | Incobotulin A (Xeomin <sup>®</sup> ) .....                           | 54 |
| 3.4.3.1. | Terapijske indikacije i doziranje .....                              | 54 |

|   |                                     |
|---|-------------------------------------|
| 3.4.3.2. Nuspojave (vrlo česte i česte) .....   | 56                                  |
| 3.4.4. Posebna upozorenja i mjere opreza pri uporabi za sva tri pripravka: Botox <sup>®</sup> ,<br>Dysport <sup>®</sup> i Xeomin <sup>®</sup> ..... | 58                                  |
| 3.5. Nove formulacije.....  | 59                                  |
| 4. RASPRAVA.....  | 61                                  |
| 5. ZAKLJUČAK .....  | 64                                  |
| 6. REFERENCE .....  | 66                                  |
| 7. ŽIVOTOPIS .....  | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |



## 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Botulinum neurotoksini (BoNT) su proteinske molekule dobivene od neurotoksičnih sojeva anaerobnih sporogenih bakterija roda *Clostridium* (*Clostridium botulinum*, *Clostridium butyrricum*, *Clostridium argentesis*) (Smith i sur., 2015), i poznati su kao najpotentniji otrov u prirodi (Hambleton, 1992).

BoNT-A se stvara kao kompleks od 900 kDa, a čini ga neurotoksična - biološki aktivna komponenta veličine 150 kDa i netoksični proteini. Netoksični proteini na molekuli BoNT nisu fiziološki aktivni, već se smatra da štite biološki aktivni dio molekule od proteolize i denaturacije pri visokoj temperaturi ili kiselom pH (Rosetto i sur., 2014; Pirazzini i sur., 2017).

Usljed trovanja s BoNT-A, dolazi do pojave botulizma koji je karakteriziran silaznom paralizom mišića (tzv. mlohava paraliza) te može dovesti do smrti otrovane osobe zbog paralize mišića nužnih za disanje. Na molekularnoj razini temelj takvog djelovanja je inhibicija otpuštanja neurotransmitora uglavnom na perifernim kolinergičkim živčanim okončinama mišićno-koštanog sustava i autonomnog živčanog sustava. Botulizam je otrovanje kod kralješnjaka, uključujući ljude, kod kojih je najčešće posljedica konzumacije neodgovarajuće pripremljene hrane, ali može nastati i zbog drugih razloga, primjerice uslijed bakterijom inficiranih rana. BoNT se već dugo klasificiraju u sedam serotipova i označeni su abecednim slovima od A do G. Međutim, molekularne genetičke analize dovele su do otkrića kodirajućih gena za neke nove podtipove BoNT (Pirazzini i sur., 2017).

Krajem 80-tih godina prošlog stoljeća pikogramske količine pročišćenog BoNT-A počele su se koristiti u liječenju različitih kliničkih stanja povezanih s povećanom mišićnom kontraktlnosti, poput strabizma i blefarospazma, da bi se indikacije s vremenom širile na druga stanja poput distonije, spastičnosti kod dječje paralize, zatim na autonomne poremećaje

(primarna aksilarna hiperhidroza), da bi od 2010. godine bio odobren u prevenciji kronične migrene (Kollew i sur., 2016). Temelj farmakološkog djelovanja BoNT-A je inhibicija lučenja neurotransmitora iz perifernih kolinergičnih, ali i senzornih okončina. BoNT-A je potentan i neurospecifičan, ima ograničen stupanj difuzije nakon lokalne primjene te je djelovanje reverzibilno. Ta svojstva garantiraju dugotrajan učinak nakon lokalne primjene u zahvaćeni mišić (3-6 mjeseci), odnosno u kožu, dobru podnošljivost te sigurnost. U međuvremenu je pokazano da BoNT-A djeluje i na parasimpatičke neurone, što je proširilo primjenu BoNT-A na liječenje autonomnih poremećaja. Temeljem istraživanja o učincima na senzorne neurone, primjena BoNT-A se danas istražuje za liječenje različitih bolnih stanja kroničnog trajanja. Temeljna istraživanja tijekom posljednjih 15-ak godina pokazala su da učinci BoNT-A nisu samo lokalni, te da nakon lokalne primjene toksin ili njegov fragment putuje u središnji živčani sustav (SŽS) retrogradnim aksonalnim transportom (Matak i Lacković, 2014).

Danas je registrirano nekoliko pripravaka BoNT-A (najpoznatiji su Botox<sup>®</sup>, Dysport<sup>®</sup>, Xeomin<sup>®</sup>), a potentnost im je izražena u internacionalnim jedinicama (i.j.). No, svaki je komercijalni proizvod BoNT-A različit s obzirom na proizvodni proces tijekom kojeg se može smanjiti aktivnost toksina, zbog čega se međusobno ne mogu jednostavno zamjenjivati. Tako je, primjerice, u kliničkim studijama utvrđeno da jednoj jedinici Botox<sup>®</sup>-a odgovara jedna jedinica Xeomin<sup>®</sup>-a, a tri jedinice Dysport<sup>®</sup>-a (Scaglione, 2016).

U nastavku teksta opisana su osnovna farmakološka obilježja botulinum toksina, s naglaskom na podtip A koji je predmet istraživanja ovog specijalističkog rada.

## 1.1. Botulinum toksini

Botulinum toksini pripadaju među najzanimljivije molekule prirodnog (bakterijskog) porijekla uopće. S jedne strane spadaju među najtoksičnije molekule u prirodi, dok su s druge strane nezamjenjivo terapijsko sredstvo za neka klinička stanja. U pozadini takve raznovrsnosti je njihov osebujan farmakološki profil, s detaljno istraženim i dobro poznatim molekularnim mehanizmom djelovanja, ali nedovoljno jasnim farmakokinetiskim profilom.

### 1.1.1. Clostridium botulinum i klasifikacija botulinskih neurotoksina

Određene klostridije, uključujući *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* i *Clostridium sordelli* su patogene, te im je svojstveno da stvaraju proteinske toksine, ali samo neke od tih vrsta su neurotoksične (Rossetto i sur., 2014).

*Clostridium* je vrsta roda sporogenih i anaerobnih gram pozitivnih, štapićastih bakterija koje uključuju više od 150 sojeva. Ove bakterije su široko rasprostanjene u okolišu i u anaerobnom okruženju crijeva mnogih životinja, gdje se uglavnom nalaze u obliku spora, pa su otporne na fizički i kemijski stres i mogu preživjeti dugi period sve do pojave povoljnih uvjeta za razvoj. U povoljnim uvjetima mikrookoliša (kao što su vlaga, nutrijenti i odsutstvo kisika) dolazi do klijanja spora u vegetativne stanice. U suprotnom, izloženost kisiku, te nedostatak vode i nutrijenata potiču sporulaciju (Rossetto i sur., 2014). Među njima *Clostridium botulinum* proizvodi botulinum neurotoksine koji su najpoznatiji otrov u prirodi (Hambleton, 1992).

*Clostridium botulinum* bakterija pripada u grupe I–IV, koje se mogu razmatrati kao zasebne vrste koje imaju zajedničko svojstvo proizvodnje botulinum toksina. *Clostridium baratii* (grupa V) i *Clostridium butyricum* (grupa VI) su dvije odvojene vrste koje također proizvode botulinum toksine (Benoit, 2018).

*C. botulinum* grupa I i II su primarno odgovorne za humani botulizam, *C. botulinum* grupa III je odgovorna za botulizam kod različitih životinjskih vrsta, a kod *C. botulinum* grupe IV nije nađeno da je povezana s botulizmom niti kod ljudi niti kod životinja. *C. botulinum* grupa I (proteolitički *C. botulinum*) je bakterija sa svojstvom proteolize koja može razgraditi neke ugljikohidrate. Mezofil je s minimalnom i optimalnom temperaturom rasta od 12°C i 37°C. Spore formirane kod soja *C. botulinum* grupe I su otporne na toplinu, ali i 'botulinsko kuhanje' (121°C/3 min). Broj gena za neurotoksine u genomu i broj formiranih neurotoksina *C. botulinum* grupe I je različit, sa sojevima koji sadrže od jedan do tri gena za neurotoksine, koji formiraju jedan do tri različitih neurotoksina. Sojevi koji sadrže 2 gena za neurotoksine mogu formirati jedan ili dva aktivna toksina (soj tipa A(B) formira aktivni neurotoksin tip A, ali ne formira aktivni tip neurotoksina B). *Clostridium sporegenes*, često se gleda kao netoksični ekvivalent *C. botulinum* grupe I. *C. botulinum* grupa II (neproteolitički *C. botulinum*) je visoko saharolitička bakterija koja fermentira veliki niz ugljikohidrata, s minimalnom i optimalnom temperaturom rasta od 3°C i 30°C. Spore formirane od strane soja *C. botulinum* grupe II su umjerene otpornosti na toplinu. Zna se da svi sojevi *C. botulinum* grupe II sadrže jedan gen za neurotoksin te formiraju jedan neurotoksin, iako je nedavno otkriveno da soj *C. botulinum* grupe II tip F još sadrži fragment od tipa B i tipa E gena za neurotoksine (Carter i Peck., 2015).

Šest filogenetski različitih klostridija (*Clostridium botulinum* grupe I-IV i sojevi *Clostridium butyricum* i *Clostridium baratii*) proizvode sedam serotipova različitih botulinum neurotoksina (BoNT) (Tablica 1). Svaki serotip toksina je kategoriziran u nekoliko subtipova ovisno o aminokiselinskoj sekvenci (Rossetto i sur., 2014).

Barash i Arnon su 2014.g. (Barash i Arnon, 2014; Carter and Peck, 2014) opisali novi serotip toksina H. Međutim, kasnije je ustanovljeno genetičkim analizama da je BoNT-H hibridna struktura koja sadrži regije slične strukturama BoNT-A1 i BoNT-F5. Serotip H je dodatno

serološki karakteriziran testom neutralizacije u miševa te je dodatno ispitan na kulturi neurona. Toksični učinak ovog hibridnog BoNT je potpuno eliminiran primjenom antitoksina serotipa A, koji je sadržan u multivalentnim terapijskim antitoksinskim proizvodima koji su glavno sredstvo liječenja botulizma kod ljudi (Johnson 2014.; Hackett i sur., 2018).

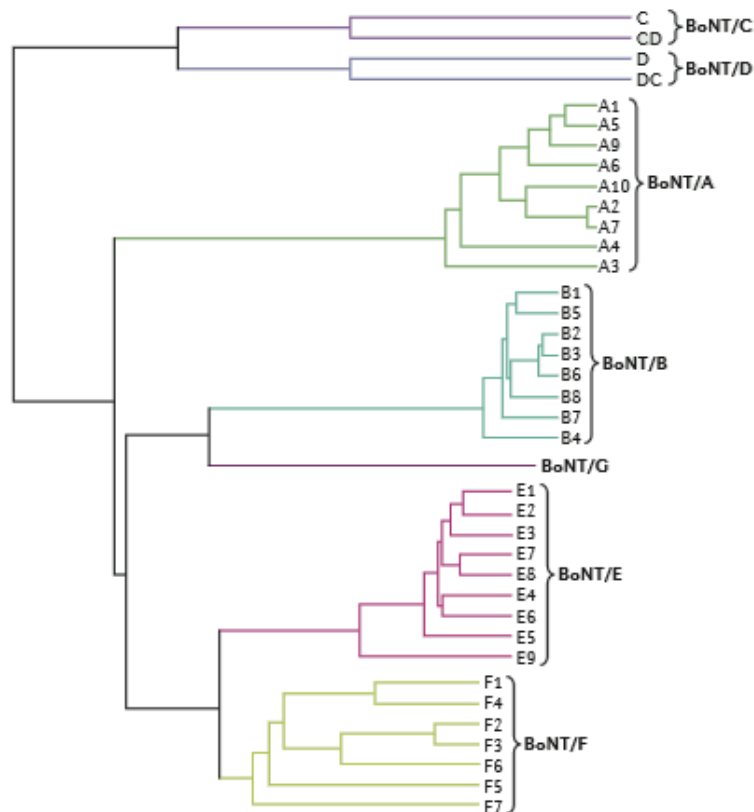
Osim već navedenih 7 serotipova, postoje i 2 mozaična BoNT. Dodatno je pokazano da neki sojevi *Cl. botulinum* proizvode mozaične proteine. D/C mozaični BoNT (BoNT-DC) se sastoji od 2/3 BoNT-D, uključujući laki lanac i H<sub>N</sub> i 1/3 BoNT/C, vezanu uz H<sub>C</sub> dio, dok C/D mozaični BoNT sadrži obrnutu strukturu od BoNT-DC (Nakamura i sur., 2012).

Botulinum neurotoksini su kompleksi biološki aktivnog proteinskog dijela s dodatnim proteinima (npr. hemaglutininom (HA) i netoksičnim nehemaglutininom (NTNH)) različitih veličina od 300 kDa do 900 kDa. Ovi dodatni proteini štite neurotoksičnu komponentu i mogu olakšati njegovu apsorpciju u organizmu. Geni koji kodiraju neurotoksine i dodatne proteine su smješteni zajedno u jedan ili dva očuvana klastera (ha klaster i orf-X klaster), a oba sadrže dvije transkripcijske jedinice. Kod *C.botulinum* grupa I i II oni su smješteni na kromosomu ili plazmidu. Jedna transkripcijska jedinica na ha klasteru kodira gene za neurotoksin i NTNH dok druga transkripcijska jedinica (transkribira suprotnim redoslijedom) kodira tri HA gena. Orf-X klaster sadrži transkripcijsku jedinicu koja kodira gene za neurotoksine i NTNH. Orf-X klaster sadrži gen (p47), što je zanimljivo gen koji kodira pozitivni regulatorni protein (botR) u sojevima *C.botulinum* grupe I, ali ne kod *C.botulinum* grupe II (Carter i sur., 2015).



**Tablica 1.** Serotipovi i subtipovi BoNT proizvedeni od vrsta Clostridium spp. (prilagođeno iz Rosseto i sur.,2014)

| <b>Clostridium vrsta</b> | Proteolotička<br><i>C.botulinum</i><br>grupa I  | Neproteolotička<br><i>C.botulinum</i><br>grupa II | <i>C.botulinum</i><br>grupa III | <i>C.argentinense</i><br>(grupa IV) | <i>C.butyricum</i> | <i>C.baratii</i> |
|--------------------------|---|---|---------------------------------|-------------------------------------|--------------------|------------------|
| <b>Tip</b>               | A; B; F   | B; E; F   | C; D                            | G                                   | E                  | F                |
| <b>Subtip</b>            | A1;A2;A3;<br>A4;A5;A6;<br>A7;A8;A9;<br>A10;<br>B1;B2,B3;<br>B5<br>(Ba);B6;B7<br>;Ab;Af84;B<br>f;F1;F2;F3;<br>F4; F5 | B4;E1;E2;E3;<br>E6;E7;E8;E9;<br>E10;E11;F6        | C;D;CD;<br>DC                   |                                     | E4;E5              | F7               |



**Slika 1.** Serotipovi i subtipovi BoNT proizvedeni od različitih grupa neurotoksigeničnih vrsta *Clostridium* spp. (modificirano prema Rosseto i sur.,2014)

Svaki serotip toksina je kategoriziran u nekoliko različitih podtipova ovisno o njihovoj amino kiselinskoj sekvenci. BoNT serotipovi C i D su međusobno usko povezani kao što su i serotipovi B i G te E i F. Također, mnogi sojevi *C. botulinum* stvaraju jedan serotip toksina dok neki proizvode više od jednog; npr. nekoliko sojeva *C. botulinum* koji uzrokuju botulizam uzrokovan hranom i infantilni botulizam proizvode toksin tipa A, a označavaju se kao A(B). Ovo otkriće sugerira da tipovi toksina u ovim sojevima aktivno evoluiraju. BoNT/DC i BoNT/CD su mozaični toksini; BoNT/DC je uzeo L lanac i HN domenu serotipa D i HC domenu serotipa C, dok BoNT/CD sadrži L lanac i HN domenu serotipa C i HC domenu serotipa D. Broj subtipova je tako narastao posljednjih godina zahvaljujući sekvencioniranju

cijelog genoma i masenoj spektrometriji kao i dostupnosti visokoafinitetnih monoklonalnih antitijela. Značajno je da *C.botulinum* sojevi iz grupa I i II proizvode najveći broj neurotoksina, dok grupa III i ostale tri klostridijske vrste proizvode samo nekoliko tipova toksina. Pretpostavljamo da je tome tako zbog razlike fiziološkog stanja bakterije u mediju. Bakterija koja proizvodi samo jedan ili nekoliko toksina vjerojatno se nalazi u obliku spora (u ovom slučaju *C. tetani*, *C.botulinum* sojevi iz grupe III i tri ostale klostridijske vrste). Kako su spore u nereplicirajućem stanju, ove bakterije imaju manje mogućnosti razvoja u odnosu na sojeve koji su uglavnom u vegetativnom stanju (kao što su one iz *C.botulinum* grupe I i II). Obzirom da je dostupnost kisika jedan od glavnih parametara koji kontrolira stupanj spora/vegetativnih stanica, možemo zaključiti da su *C.tetani*, *C.botulinum* grupa III i *C.argentinense* striktni anaerobi dok su *B. clostridium* grupa I i II sposobne rasti u mikro aerofilnom okruženju (Rossetto i sur., 2014).

### **1.1.2. Povijesni pregled**

Slučajevi botulizma su povezani s lošim skladištenjem hrane još od antičkog doba. Uistinu, slučajevi trovanja koji su pripisani *Atropi belladonna* su najvjerojatnije bili uzrokovani botulizmom nakon trovanja hranom. Godine 1793. opisana je zaraza 13 osoba u Wilbadu, selu u jugozapadnoj Njemačkoj, a svih 6 umrlih su imali pojavu midrijaze za što je okrivljena *A.belladonna*. Slučaj botulizma u Wilbadu je kasnije povezan s konzumacijom loše obrađenih svinjskih iznutrica u krvavicama. Tijekom 19. stoljeća opisani su brojni slučajevi botulizma, najčešće uslijed konzumacije neadekvatno skladištene i pripremane hrane te loših higijenskih uvjeta. Justinus Andreas Christian Kerner, njemački liječnik i pjesnik je prvi objavio opise osoba otrovanih s botulinum toksinom 1817. i 1820. godine. Kerner je nastavio istraživanja te je prvi identificirao ‘masni otrov’ kao uzrok trovanja. On je ekstrahirao ‘masni otrov’ iz ‘kiselih’ kobasica i aplicirao ga u životinje, uključujući ptice, mačke, zečeve, žabe, muhe,

skakavce i puževe. Nadalje, Kerner je testirao ‘masni otrov’ na samom sebi, primjetivši da samo par kapi na jezik uzrokuje jako sušenje nepca i ždrijela. U njegovoj monografiji, predložio je hipotezu da ‘masni otrov’ iz kiselih kobasica ometa rad živčanih stanica što dovodi do kliničke slike botulizma. Godine 1869., njemački liječnik John Muller je uveo izraz ‘botulizam’ od lat. ‘botulus’ (kobasica). Dvadesetak godina kasnije mikrobiolog Emile Pierre-Marie van Ermengem na Sveučilištu u Ghentu izolirao je anaerobni mikroorganizam iz kontaminirane kisele i sušene šunke i nazvao ga *Bacillus botulinus*, a njemački liječnik Ludwig Brieger je povezao izoliranu bakteriju s Kernovim i Ermengemovim otkrićima. Godine 1917., Američko društvo bakteriologa u ‘Karakterizaciji i klasifikaciji bakterijskih tipova’ diferencirali su sojeve *Bacillus* i *Clostridium* u 2 različita reda, pri čemu su bakterije roda *Bacillus* aerobni mikroorganizam, dok je *Clostridium* anaerobna bakterija, vretensastog ili elipsoidnog oblika (*clostridium* dolazi od grčke riječi kloster, što znači vreteno) (Monheit i Picket, 2017).

U početku su mikrobiolozi vjerovali da je trovanje zaraženom hranom jedini način otrovanja. Međutim, opažanja u praksi i istraživanja povezana s time su dovela do značajnih otkrića, a to je da postoje i drugi načini trovanja. Prvi slučaj botulizma u novorođenčadi opisan je u Kaliforniji 1931., a najvjerojatnije je bio povezan s uzimanjem kontaminiranih mliječnih proizvoda, da bi znanstvenici 40-tak godina kasnije otkrili spore bakterije u crijevima beba. U međuvremenu, 1945., Ivan Clifford Hall na Sveučilištu Columbia je izolirao *C.botulinum* tip A iz dvije otvorene rane i tip B iz tkiva nekoliko fraktura (Monheit i Picket, 2017).

Već je 1910. njemački mikrobiolog J. Leuchs pretpostavio postojanje više tipova toksina da bi 1919. godine Georgina Burke sa Sveučilišta Stanford istražila 12 sojeva *C.botulinuma*, te identificirala dva toksina, koje je nazvala A i B, da bi nekoliko godina kasnije identificirala treći tip C. Temeljem istraživanja koja su slijedila, danas govorimo o 4 fenotipske grupe i

genotipska soja *C.botulinum* (grupe I-IV) i o 7 različitih antigenih tipova toksina (A-G). Ove fenotipske grupe proizvode različite neurotoksine: grupa I proizvodi A, B i F; grupa II proizvodi B i E; grupa III proizvodi C i D i grupa IV proizvodi G. Odnosno, usko srodne bakterije *C.baratii* i *C.butyricum* proizvode toksine E i F (Monheit i Picket, 2017).)

Kemijska izolacija BoNT-A (koristeći selektivnu adsorpciju na koloni aluminijevog hidroksida, elucijom sa sekundarnim amonijevim fosfatom zatim dijalizom i evaporacijom) opisana je 1928. na Sveučilištu u Kaliforniji, a 1946. Carl Lamana i sur. su pročistili kristalični BONT-A, što je nekoliko desetljeća kasnije otvorilo put ka terapijskoj primjeni BoNT-A.

Kerner je bio prvi koji je potpuno opisao karakteristične neurološke simptome botulizma, koji uključuje diplopiju (vrlo često kao prvi simptom), povraćanje, crijevne grčeve, midrijazu, ptozu, disfagiju i respiratorno zatajenje. Mnogo godina prije otkrića *C.botulinum*, ova klinička prezentacija je moguće ukazala na drugu „stranu medalje“ budući da je sam Kerner predvidio da se botulinum toksin može upotrebljavati u terapijske svrhe da se smanji aktivnost simpatičkog živčanog sustava kod pacijenata s poremećajima pokreta i kod hipersekrecije tjelesnih tekućina, kod čireva, kod bjesnoće, kuge i stanja povezanih s plućnom tuberkulozom i žutom groznicom. Ipak, prošlo je više od 150 godina do prvih istraživanja niskih subtoksičnih doza BoNT-A u bolesnika. Začetnik takvih istraživanja bio je Alan Scott, oftalmolog s Instituta u San Francisku (Monheit i Picket, 2017).

Nekoliko istraživača prije Scotta su pretpostavili da različite tvari s toksičnim učinkom na neurone i mišiće mogu popraviti stanje kod bolesnika sa strabizmom tako da relaksiraju periokularne mišiće. Oftalmolog Conrad Berens je bio prvi koji je pokazao da injiciranje alkohola u ljudski ekstraokularni mišić može uzrokovati paralizu mišića. Nekoliko drugih znanstvenika su isprobavali u to vrijeme različite alternativne toksine, iako njihovi rezultati

nisu javno objavljeni i bili su dio osobne komunikacije sa Scottom. Tijekom 1960-ih Scott je ispitivao nekoliko supstanci u majmuna s kirurški induciranim strabizmom. Oftalmolog Alfred Maumenee mu je predložio injiciranje BoNT-A te je od Edwarda Schantza sa Sveučilištu Wisconsin Scott dobio visoko pročišćen kristalični toksin koji je injicirao pacijentima sa strabizmom, a istovremeno je radio ispitivanja i sa saksitoksinom, toksinom iz algi dinoflagelate *Gonyaulax catenella* koja je odgovorna za neke slučajeve trovanja morskom hranom. Oba toksina uzrukovala su lažnu paralizu skeletnih mišića. Ipak, zbog dugotrajnog, ali i reverzibilnog djelovanja primjećenog najprije kod botulizma, BoNT-A je postao neurotoksin izbora s kojim su nastavljena daljnja klinička ispitivanja (Monheit i Picket, 2017).

Godine 1973. Scott je objavio rezultate studije u kojoj je injicirao BoNT-A Rhesus majmunima s induciranim strabizmom. Dugotrajna korist BoNT-A je bila očigledna čak i iz ovih inicijalnih studija. Injiciranje BoNT-A dovelo je do pareze koja je, ovisno o dozi, trajala između 2 tjedna i 8 mjeseci. Scott je predložio da BoNT-A može zamijeniti ili povećati učinak postojećih metoda kirurške korekcije strabizma te smanjiti broj treptaja, reducirati blefarospazam i utjecati na grupu skeletnih mišića. Scott je rezultate na 19 pacijenata sa strabizmom kojima je ukupno injicirano 67 doza BoNT-A objavio 1979.g. u časopisu *Ophthalmology*. Maksimalna paraliza je zapažena 4 do 5 dana nakon injiciranja. Idući rad je slijedio već objavljene rezultate, 132 doze BoNT-A Scott je aplicirao u 42 pacijenta sa strabizmom. Učinak nakon jednokratne primjene trajao je do 411 dana. Scott je komercijalizirao BoNT-A kao Oculinum<sup>®</sup> kroz vlastitu kompaniju Oculinum, Inc. (Berkley, CA). Američka agencija za hranu i lijekove (eng. Food and Drug Administration, FDA) je odobrila BoNT-A za blefarospazam i strabizam 1989. godine. Američka kompanija Allergan (Irvine, CA) je kupila Oculinum<sup>®</sup> vrlo brzo nakon što je licenciran u SAD-u i onda je rebrandiran kao Botox<sup>®</sup> (Monheit i Picket, 2017).

### 1.1.3. Botulizam

Botulizam je trovanje uzrokovano neurotoksinima iz različitih grupa *C.botulinum* i karakterizirana je simetričnom, spuštajućom paralizom. Simptomi botulizma se mogu pojaviti i u središnjem živčanom sustavu kao i u probavnom traktu otrovanih osoba. Mnogo različitih dijagnoza može ući u diferencijalnu dijagnozu, uključujući upalu grla, gastroenteritis, sepsu, intestinalnu opstrukciju, miasteniju gravis, encefalitis, mišićnu distrofiju, disbalans elektrolita, meningitis, poliomijelitis, cerebrovaskularni ispad, Guillain-Barre sindrom, trovanje hranom, Reyev sindrom, hipotiroidizam, trovanje teškim metalima, trovanje ugljičnim monoksidom i ugriz zmijske. Kod infantilnog botulizma dodatni simptomi ulaze u diferencijalnu dijagnozu: neuspjeh u napredovanju, akutna infantilna polineuropatija, dehidracija i razni nasljedni i metabolički poremećaji. Liječnici su često propuštali dijagnosticirati botulizam dojenčadi, ali to uvijek treba razmotriti ako postoji neki od tipičnih simptoma (Baron, 1996).

Postoji nekoliko oblika botulizma povezanih s putem unosa toksina u organizam (probavni, anaerobno putem rane, respiratornim putem, intramuskularnom injekcijom prekomjernih doza) ali, u bilo kojem slučaju, glavni patološki simptom je generalizirana periferna neuroparaliza različitog opsega koja uključuje i skeletni i autonomni živčani sustav (Johnson i Montecucco, 2008).

Patogenost *C.botulinum* ovisi u potpunosti o proizvodnji neurotoksina. Kod ljudi, ovi toksini uzrokuju bolest na tri načina: dobro poznata forma trovanja hranom koja je rezultat unosa toksina nepropisno obrađenom hranom, botulizam preko rane koji je rezultat rasta *C.botulinum* u nekrotičnom tkivu rane te infantilni botulizam koji je rezultat proizvodnje toksina u probavnom traktu dojenčeta. Od mjesta ulaska u tijelo, toksin putuje putem krvi i limfnog sustava (te vjerojatno živčanog sustava). Nakon raspodjele u tkiva, selektivno se veže na kranijalne i periferne živce, ali uglavnom djeluje na periferni živčani sustav. Toksin se

veže za receptore na membranama motoneurona te inhibira otpuštanje acetilkolina. Rezultat je mišićna paraliza. Kranijalni živci su prvi zahvaćeni te su praćeni silaznom, simetričnom paralizom motoričkih živaca. Rana zahvaćenost kranijalnih živaca uzrokuju problem s vidom, sluhom i govorom. Dupli ili zamagljeni vid, proširene zjenice i nerazgovjetan govor su česti simptomi. Smanjena proizvodnja sline uzrokuje suhoću usta i grla te može biti otežano i bolno gutanje. Potom dolazi do opće slabosti praćene padajućom paralizom gdje je kritično uključanje dišnih putova. Smrt je obično uzrokovana respiratornim zatajenjem, ali i srčano zatajenje može biti primarni uzrok smrti. Mortalitet je najviši kod tipa A, nakon toga kod tipa E te potom tipa B, što je vjerojatno u skladu s afinitetom vezanja toksina za neurone. Stope smrtnosti su izravno proporcionalne dozi (količini unešenog toksina) i obrnuto proporcionalne vremenu inkubacije (Baron, 1996).

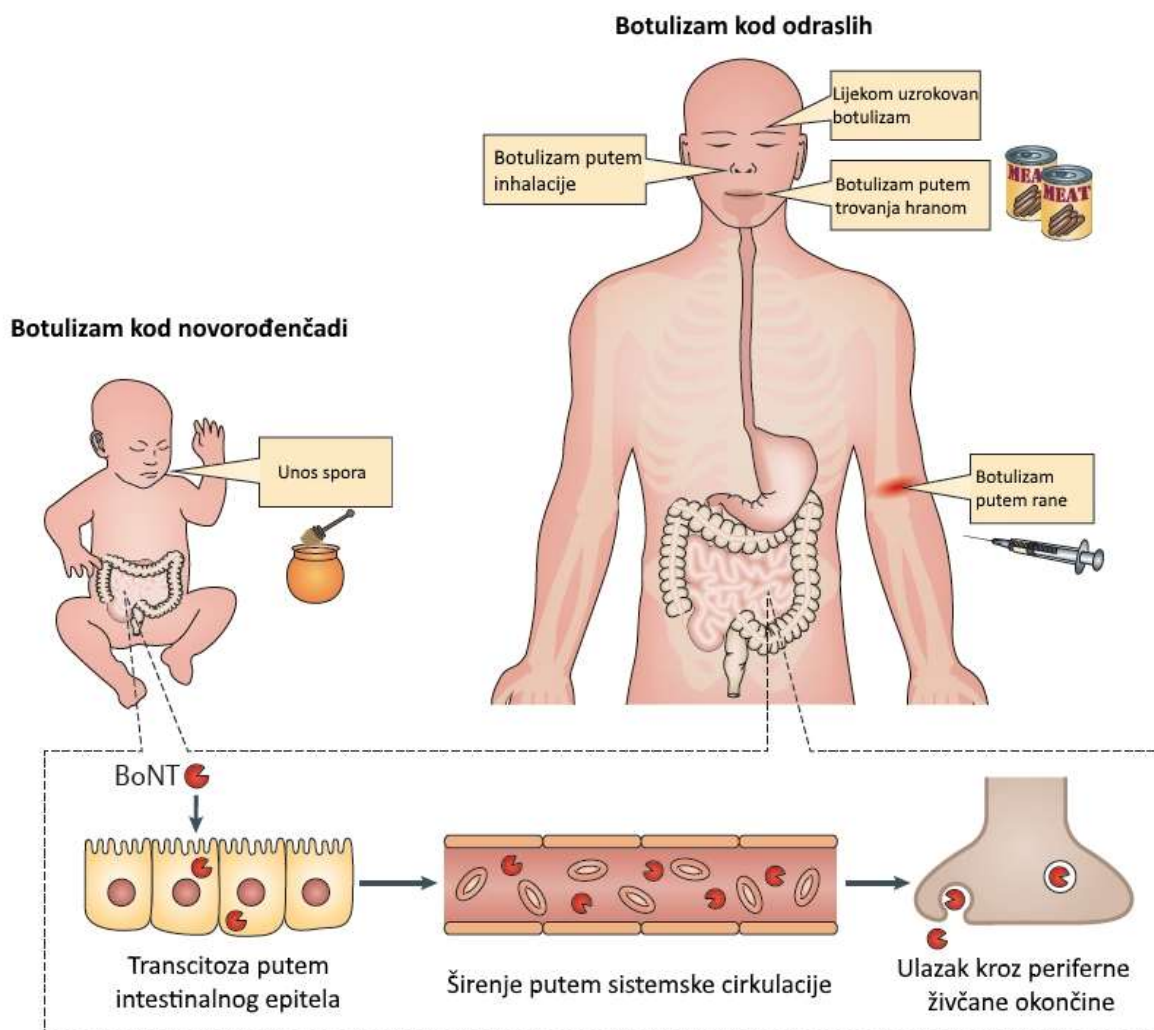
Procjenjuje se da je letalna količina kristaliničnog botulinum toksina tipa A oko 70 µg kod peroralnog unošenja, 0,09-0,15 µg uslijed intravenske i intramuskularne primjene, odnosno 0,70-0,90 µg ako se inhalira, što ga čini najpotentnijim otrovom u prirodi.

Toksin u organizam može ući putem probavnog trakta, udisanjem i putem rana. Premda je riječ o velikoj proteinskoj molekuli, ona se uspijeva apsorbirati iz probavnog trakta. Tako BoNT-A pripada rijetkim proteinskim molekulama koje odolijevaju uvjetima u želucu i crijevima, te se uspijevaju apsorbirati i zadržati biološku aktivnost/toksičnost. Nedavnim je istraživanjem fluorescentnim označavanjem molekule toksina i vizualizacijom njegova kretanja kroz probavni sustav pokazano da se toksin veže na apikalnoj površini epitelne stanice tankog crijeva, nakon čega se internalizira kroz apikalnu membranu (unutar 5 min) (Rosseto i sur., 2014). Nakon internalizacije, molekule toksina se rasprše po citosolu, te migriraju prema bazolateralnoj membrani epitelne stanice kroz koju prolaze transcitozom nepromijenjene.



Botulinum toksin može ući u organizam i kroz respiratorni sustav, nakon inhalacije. Kao i u slučaju stanica probavnog sustava, alveolarne epitelne stanice ili stanice nazalnog epitela vežu i prenose toksin u smjeru bazolateralne membrane gdje on izlazi iz stanica u nepromijenjenom, aktivnom obliku. Nakon ulaska u sistemske cirkulaciju, pretpostavlja se da BoNT-A izlazi iz krvnih žila, difundira kroz izvanstanični prostor, te konačno dolazi do ciljnih stanica, tj. kolinergičnih živčanih završetaka. Međutim, mehanizam prolaska kroz endotelne barijere još uvijek nije dovoljno istražen. Moguće je da se, kao i kod stanica probavnog sustava, radi o endocitozi i transcitozi, a moguć je i paracelularni prolazak (Rosseto i sur., 2014). Uvriježeno je mišljenje da BoNT-A ne prolazi krvno-moždanu barijeru budući da su simptomi botulizma uglavnom posljedica periferne blokade kolinergičnih živaca. Temeljna istraživanja tijekom posljednjih 15-ak godina pokazala su da učinci BoNT-A nisu samo lokalni, te da nakon lokalne primjene toksin ili njegov fragment putuje u SŽS retrogradnim aksonalnim transportom (Matak i Lacković, 2014).

Botulinum toksin u organizam može ući i putem otvorenih rana ili ranjavanjem onečišćenim predmetima (uključivo injekcione igle) (Bach-Rojecky i sur., 2007).



**Slika 2.** Botulizam (prilagođeno iz Rosseto i sur., 2014)

### 1.1.3.1. Trovanje hranom

Kod botulizma uzrokovanog trovanjem hranom toksin je proizveden od strane vegetativnih oblika *C.botulinum* prisutnih u hrani. Vrijeme inkubacije može varirati od nekoliko sati do desetak dana, ali najčešće je između 18 i 36 sati. Samo se manji dio unešenog toksina apsorbira iz gastrointestinalnog trakta dok se ostatak izluči putem fecesa. Gastrointestinalne smetnje su početni simptomi bolesti kod gotovo trećine pacijenata otrovanih s toksinima tipa A i B, a gotovo kod svih pacijenata zaraženim toksinom tipa E. Simptomi uključuju mučninu i

povraćanje te abdominalnu bol. Često je uključen i proljev, ali može doći i do opstipacije (Baron, 1996). Izvorno, botulizam uzrokovan trovanjem hranom se često povezuje s određenim vrstama hrane, poput meda, kobasica, međutim *C.botulinum* isto tako može „rasti“ u različitim vrstama hrane kao što je povrće, riba, voće i začini. Kućno konzerviranje koristeći neodgovarajuće tehnike sterilizacije je odgovorno za mnoge slučajeve botulizma tijekom prošlog stoljeća. Spore su otporne na temperaturu i mogu preživjeti 100°C satima, ali je toksin relativno termički nestabilan. Toksin se obično proizvodi pri pH 4,8-8,5, ali opisani su slučajevi trovanja i s jako kiselim hranom (kod pH<4,6). Općenito, germinacija spora je česta u hrani koja se čuva na toplom i pod anaerobnim uvjetima duže vrijeme (Baron, 1996).

Nepravilna primjena 'botulinskog kuhanja' (121 °C/3min) za konzerviranu ili flaširanu hranu dovela je do pojave botulizma povezanih s *C. botulinum* grupe I. Primjerice, veliko trovanje na Tajlandu 2006. godine povezano je s konzumacijom neodgovarajuće konzerviranih bambusovih klica. Neadekvatna termalna obrada konzervi komercijalnog hot-dog čili umaka 2007. godine u SAD-u za posljedicu je imala osam slučajeva botulizma zbog čega je s tržišta povučeno 39 milijuna konzervi u prvoj, odnosno oko 111 milijuna konzervi u drugoj fazi (Carter i Peck, 2015).

Sojevi *C. botulinum* grupe II stvaraju neurotoksin tipa B i uglavnom su bili povezani s botulizmom uzrokovanim konzumacijom mesnih proizvoda u Europi te ponekad uz riblje proizvode u Sjevernoj Americi. Botulizam povezan s *C. botulinum* grupe II (neurotoksin tipa E) je najčešće povezan s trovanjem ribom (npr. vakumirana, dimljena, usoljena ili sušena), a opisani su slučajevi na sjeveru Kanade, na Aljasci te u Francuskoj 2009. Godine. Može se zaključiti da je najveći rizik od trovanja kod konzumacije minimalno termički obrađene, ohlađene hrane, te hrane konzervirane u neodgovarajućim uvjetima (konzerve) (Carter i Peck, 2015).

### **1.1.3.2. Botulizam putem rane**

Botulizam putem rane je nastaje vrlo rijetko. Početni događaj je kontaminacija rane bakterijom *C. botulinum* koja je ograničena na nekrotično tkivo gdje dolazi do nastanka toksina (rana može biti kontaminirana s *C. botulinum*, ali bez stvaranja toksina i razvijenih simptoma botulizma). Vrijeme inkubacije varira od nekoliko dana do skoro dva tjedna. Jedina razlika između simptoma kod botulizma putem rane i otrovanja hranom (osim u dugotrajnijem periodu inkubacije) je da botulizam putem rane nema gastrointestinalne simptome te rana eksudira i može doći do povišene temperature. Bilo je nekoliko prijavljenih slučajeva botulizma putem rane kod i.v. ovisnika o drogama koji se smatraju rizičnom populacijom (Baron, 1996).

### **1.1.3.3. Novorođenački botulizam**

Suprotno od trovanja hranom s toksemijom uzrokovanom gutanjem određenog toksina, infantilni botulizam je rezultat germinacije spora u gastrointestinalnom traktu. Ovdje se vegetativne stanice repliciraju i oslobađaju botulinum toksin. Čini se da je to posljedica drugačije mikrobiološke flore novorođenačkog gastrointestinalnog trakta. Skoro svi prijavljeni slučajevi kod novorođančadi pojavili su se između 2 tjedna i 6 mjeseci starosti, a uzrokovani su toksinima A i B. Kod novorođenačkog botulizma najčešće je prvi simptom konstipacija. Dijete tada postaje letargično i spava više nego inače. Refleks sisanja se smanjuje te disfagija postaje očigledna kao i slinjenje. Zatim se gubi kontrola glave i dolazi do lažne paralize djeteta te do respiratornog aresta. Novorođenački botulizam može biti smrtonosan (Baron, 1996).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Bakterija *Clostridium botulinum* proizvodi sedam različitih serotipova botulinum toksina koji u vrlo niskim (mikrogramskim) dozama uzrokuju botulizam. Posljednjih 30-tak godina pikogramske doze pročišćenog botulinum toksina tipa A (BoNT-A) koriste se u terapijske svrhe, od liječenja poremećaja praćenih povećanom mišićnom kontrakcijom (strabizam, distonije, cerebralna paraliza, korekcije bora i dr.), do prevencije kronične migrene. Širenje odobrenih indikacija za primjenu, kao i *off-label* primjena u kliničkoj praksi temelji se na posebnim farmakološkim karakteristikama same molekule BoNT-A, pri čemu su dugotrajno djelovanje nakon jednokratne lokalne primjene te dobra podnošljivost svojstva koja ga razlikuju od drugih lijekova. Cilj ovog rada je dati pregled farmakoloških svojstava BoNT-A i tri registrirana pripravka na globalnom tržištu, s naglaskom na odobrene indikacije za primjenu, kao i indikacije koje su trenutno u fazama kliničkih istraživanja.

### 3. MATERIJAL I METODE

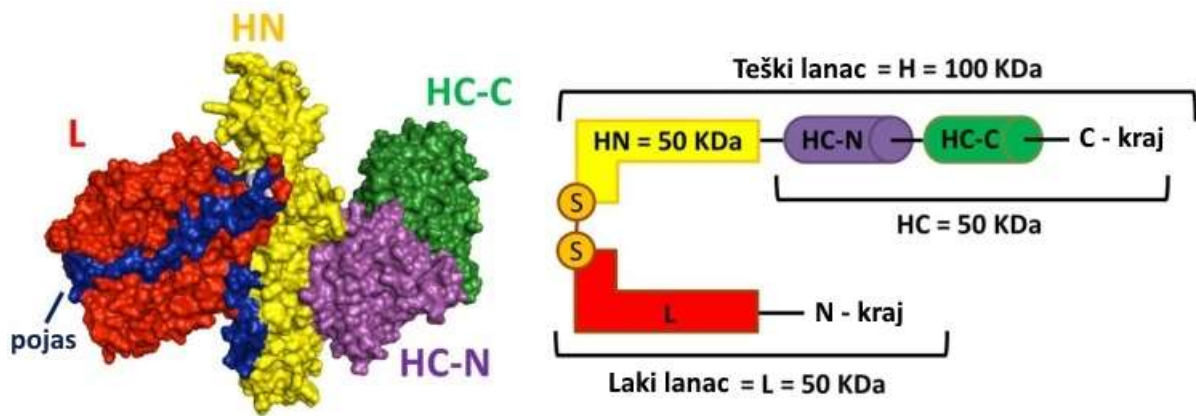
Za potrebe ovog specijalističkog rada pretraživana je relevantna znanstvena i stručna literatura, znanstvene publikacije, baza lijekova Agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED), mrežne stranice Europske agencije za lijekove (EMA), te Američke agencije za hranu i lijekove (FDA).

Bibliografske baze podataka pretraživane su prema ključnim riječima: *botulinum toxin type A*, *Botox*, *Dysport*, *Xeomin*, *indications*, *mechanism of action*, *side-effects*, *dosing*, *clinical effect*, *clinical trials*, *disease*.

#### 3.1. Farmakološke karakteristike BoNT-A

##### 3.1.1. Struktura BoNT-A

BoNT sintetizira *C. botulinum* kao kompleks od 900 kDa. Najveći dio tog molekularnog kompleksa čine netoksični hemaglutinini i drugi ne-hemaglutininski proteini. Oni su fiziološki neaktivni, a smatra se da štite biološki aktivni dio molekule od proteolize i denaturacije pri visokoj temperaturi ili kiselom pH, odnosno prilikom prolaska kroz probavni sustav i u izvanstaničnom prostoru. Usprkos varijabilnosti u aminokiselinskom slijedu i imunološkim razlikama, svi serotipovi BoNT-a pokazuju sličnu molekularnu arhitekturu. Biološki aktivni dio toksina čini 1296 aminokiselina, a postoji kao lanac od ~150 kDa koji se sastoji od lakog lanca (L lanac; koji ima 50 kDa) i teškog lanca (H lanac; 100 kDa), povezanih disulfidnom vezom, kako je prikazano shematski na Slici 3 (Rosseto i sur., 2014).



**Slika 3.** / Struktura izoliranog kompleksa BoNT molekule (prilagođeno prema Tehran i Pirazzini, 2018)

Molekularna struktura botulinum neurotoksina (BoNT) koja se sastoji od četiri funkcionalne poddomene označene različitim bojama: HC-C (u zelenoj boji) i HC-N (u ljubičastoj boji) posreduju vezanje toksina na membranu neurona; HN (žuto) posreduje translokaciju L metaloproteaze (crveno) u citosol. HN i L lanac drže se zajedno preko disulfidne veze (bijelo) i brojnim interakcijama protein-protein koje uključuju velik broj HN ostataka, poznat kao pojas (plavo), koji potpuno okružuje katalitičku domenu. Desno je prikaz dvostrukog lanca i funkcionalne poddomene.

Slično svim bakterijskim egzotoksinima koji imaju intracelularni ciljni protein, BoNT je sastavljen od nekoliko domena koje imaju različite funkcije tijekom procesa intoksikacije: L lanac je metaloproteazna domena koja specifično cijepa jedan od SNARE (eng., *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) proteina koji su neophodni za egzocitozu neurotransmitora; HC domena (C-terminalni kraj H lanca) odgovorna je za presinaptičko vezanje i endocitozu, a sastavljena je od dvije subdomene koje imaju različita svojstva sklapanja i vezanja; dok je HN domena (N-terminalni kraj H lanca) zaslužna za translokaciju L lanca preko membrane endosomskih vezikula u neuronski citosol (Slika 3).

Jedinstveno svojstvo BoNT je prisutnost peptidnog pojasa koji okružuje L lanac i čvrsto ga veže na HN domenu (Rosseto i sur., 2014).

Temeljem činjenice da toksin uglavnom nastaje u uvjetima raspadanja biološkog materijala, gdje ostaje aktivan mjesecima pa čak i godinama, misli se da je glavna uloga netoksičnih nehemaglutininskih proteina zaštita BoNT od pH denaturacije i djelovanja mnogih proteaza i protein-modificirajućih tvari koji su prisutni u okruženju, dok je protekcija biološki aktivnog dijela molekule tijekom prolaska kroz gastrointestinalni trakt vjerojatno njihova sekundarna uloga NTNHA (Rossetto i sur., 2014).

Hemaglutininski proteini na nativnom polipeptidnom lancu ne stvaraju veze niti s nehemaglutininskim, niti s biološki aktivnim dijelom molekule. Imaju devet potencijalnih ugljikohidratnih veznih mjesta što bi moglo biti značajno pri vezanju toksina za sloj intestinalne sluzi i apikalnu membranu polariziranih epitelnih stanica ili drugih stanica preko kojih toksini ulaze u limfatičku cirkulaciju. Hemaglutininski kompleks tada disocira s proteinskog kompleksa i remeti epitelnu barijeru i otvara paracelularni put toksinu. Suprotno tome, druge studije dokazuju da je neovisno o hemaglutinom-posredovanom transportu, BoNT i sam sposoban prijeći epitelne stanice iako s manjom učinkovitošću (Rossetto i sur., 2014).

### **3.1.2. Farmakokinetika BoNT**

Sistemska farmakokinetika BoNT ispitana je samo za veće suprat terapijske doze (mikrogramske količine) toksina kod glodavaca budući da je farmakokinetička ispitivanja za niže (nanogramske) doze toksina, koje se koriste u terapiji, gotovo nemoguće provesti zbog preniskih sistemskih koncentracija i nedovoljno osjetljivih metoda. Za suprat terapijske doze i.v. primijenjenog toksina u miševa pokazano je da ima dvije faze distribucije: prva od nekoliko minuta nakon čega se postiže pseudoravnotežno stanje i slijedi druga faza od nekoliko sati tijekom koje se toksin eliminira. Čini se da je molekula toksina u cirkulaciji

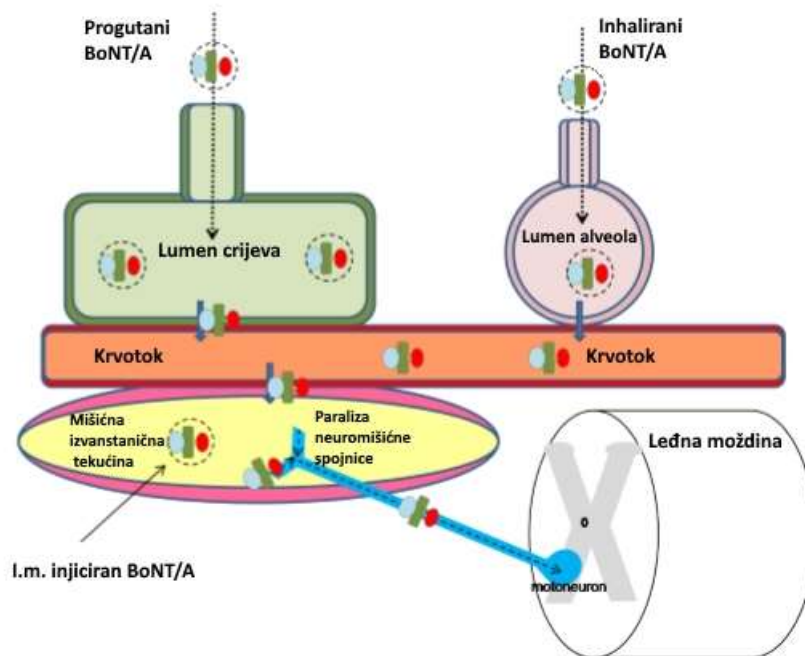


visoko otporna na razgradnju budući da se može detektirati i nekoliko sati nakon i.v. primjene u miševa, odnosno čak i do desetak dana kod ljudi nakon oralnog trovanja. Tako cirkulacija predstavlja „depo“ intaktnog biološki aktivnog toksina u organizmu sve dok on ne dospije do ciljnih mjesta djelovanja (kolinergičnih neurona) ili se ne eliminira iz organizma (Simpson, 2013). O sudbini cirkulirajućeg toksina se ne zna gotovo ništa, moguće je da se metabolizira u jetri, međutim može se zaključiti da je titar cirkulirajućeg BoNT toliko nizak (čak i nakon primjene visokih multiletalnih doza) da ga niti endogeni mehanizmi eliminacije ne mogu detektirati. Nasuprot tome, nakon ulaska u neuron, dolazi do brze razgradnje molekule BoNT.

O farmakokinetičkim parametrima nakon ulaska toksina u periferne živčane okončine malo je podataka, odnosno nije jasno na koji se način i nakon koliko vremena biološki aktivni dio toksina eliminira iz neurona. Gotovo se ništa ne zna o sudbini dugog lanca nakon translokacije kratkog lanca iz endosoma u citosol. Temeljem iskustva s primjenom u kliničkoj praksi, posebice zbog dugotrajnog djelovanja jednokratno primijenjenog BoNT-A, možemo pretpostaviti da toksin izbjegava proteosomalnu degradaciju te da aktivna proteaza ostaje dugo vremena stabilna u citosolu, a otvorena je i mogućnost pasivne retrogradne difuzije kratkog lanca iz okončine prema tijelu neurona (Simpson, 2013).

Primjenom BoNT-A u terapijske svrhe također se primijetila distribucija toksina izvan mjesta injiciranja (u okolne mišiće) što izaziva lokalizirane nuspojave kao što su neželjena paraliza susjednih mišića. Odgovarajuće izabran volumen, doza i metoda injektiranja može smanjiti incidenciju nuspojava induciranih raspršenjem toksina sa samog mjesta injiciranja. Dodatni proteini BoNT-A, koji brzo disociraju s 150 kDa kod fiziološkog pH, ne doprinose značajnom širenju toksina u okolno tkivo. Također, cirkulirajući toksin ne mora proći krvno-moždanu barijeru, već može doći do SŽS aksonalnim putem senzornih i motornih neurona (Matak i Lacković, 2015). Farmakokinetika BoNT-A je shematski prikazana na Slici 4. Klasična

ispitivanja apsorpcije, distribucije, biotransformacije i eliminacije djelatne tvari nisu provedene zbog prirode lijeka (Matak, 2015).



**Slika 4.** Farmakokinetika BoNT-A (prilagođeno iz Matak, 2015)

*Progutan ili inhaliran kompleks BoNT-A dolazi u lumen unutarnjih organa ili plućnih alveola te neurotoksični dio ulazi u krvotok putem transcitoze preko epitelnih slojeva. To je praćeno sistemskom distribucijom toksina u ekstracelularne tekućine perifernih tkiva, kao što su mišići (pomoćni protein su naznačeni isprekidanom kružnom linijom koji disociraju s neurotoksičnog dijela molekule veličine 150 kDa). Sistemskom distribucijom ili izravnim intramuskularnim injiciranjem BoNT-A ulazi u neuromuslularnu spojniciu te uzrokuje lokalnu paralizu injiciranog mišića. Cirkulirajući BoNT ne može prijeći krvno moždanu barijeru, međutim dio BoNT-A se retrogradno transportira putem perifernih živaca do SŽS. Povoljne farmakokinetičke karakteristike za visoku toksičnost BoNT-A su: sposobnost prolaska kroz gastrointestinalni trakt, mogućnost prolaska kroz epitelne slojeve i ulazak u cirkulaciju te dovoljno dugačko vrijeme poluživota u sistemskoj cirkulaciji putem koje se distribuira u dovoljnim količinama do živčane okončine za koje se specifično veže i posebnim mehanizmima ulazi u citosol.*

### **3.1.3. Mehanizam djelovanja BoNT**

Kao što je prethodno u tekstu naglašeno, djelovanje BoNT jedinstveno je po tome što se između stotine različitih tipova stanica u organizmu kralješnjaka specifično u niskim koncentracijama veže za periferne živčane završetke, s najvećim afinitetom za mišićne i autonomne kolinergičke živce (Rosseto i sur., 2014).

#### **3.1.3.1. Dvostruko vezanje za receptore**

Selektivno djelovanje na presinaptičku membranu živčanih završetaka BoNT proizlazi iz jedinstvenog načina vezanja preko dvaju neovisnih receptora: jedno mjesto na membrani je polisialogangliozidske strukture (PSG), a drugo je za protein sinaptičke vezikule (SV2). Neurospecifično i preferencijalno vezanje za kolinergičke živčane završetke moguće da je posljedica posebne strukture N-glikana na SV2 proteinu, što je različito od tipa glikana na drugim neuronalnim okončinama. Ovakvo specifično vezanje može objasniti učinkovitost BoNT i u uvjetima vrlo niske koncentracije, usprkos brzom protoku izvanstanične tekućine i male površine perifernih živčanih završetaka u odnosu na površinu drugih BoNT-u izloženih stanica (Rosseto i sur., 2014).

#### **Početno vezanje**

‘Evolucijski izbor’ PSG kao prvog presinaptičkog receptora s kojim BoNT dolazi u kontakt na živčanom završetku se čini idealnim, s obzirom da je PSG vrlo zastupljen na presinaptičkoj membrani, te je organiziran u mikrodomene koje isto tako uključuju glikoproteine i njihov fleksibilan oligosaharidni dio (BoNT vezujući dio). PSG formira velike nakupine glikolipida u kompleksu s oligosaharidima koji mogu tvoriti vrlo specifične interakcije s ciljanim proteinima. PSG također utječe na transmembransku signalizaciju, endocitozu i prijenos vezikula. U neposrednoj blizini BoNT PSG ima funkciju ‘antene’ za koju se veže C domena

dugog lanca toksina, i to na distalni dio šećernog dijela. BoNT je dipol s pozitivno nabijenim krajem koji je blizu vezujućeg dijela za PSG, a sam PSG i ostali anionski lipidi mogu dovesti do reorijentacije dipola BoNT kada se ovaj približi membrani kako bi vezanje za PSG bilo što uspješnije. Istraživanja na miševima su pokazala da se stotine BoNT-A i BoNT-B molekula vežu na kvadratni mikrometar presinaptičke membrane motoneurona (Rosseto i sur., 2014).

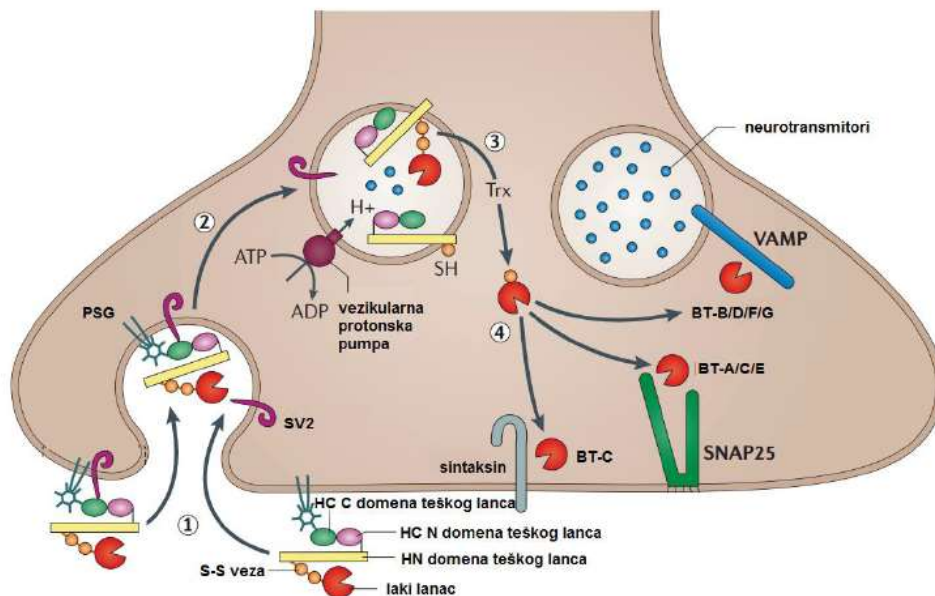
### **Funkcionalno vezanje**

Nakon vezanja na PSG, BoNT-B1, BoNT-D i C te BoNT-G se preko vezujućeg mjesta na HC-C domeni koja je blizu veznog mjesta na PSG vežu i na ekstracelularni segment sinaptotagmina (Syt) – proteina smještenog na membrani sinaptičkog mjehurića. Međutim, ta dva mjesta su strukturno odvojena i interakcije kod vezanja s PSG i sinaptotagminom su neovisne jedno o drugoj. Za razliku od njih, BoNT-A1 i BoNT-E1 se vežu specifično za dva segmenta četvrte luminalne petlje transmembranskog proteina sinaptičkog vezikula SV2, pri čemu se izoforma SV2C čini da je glavni receptor koji je uključen u BoNT-A1 vezanje in vitro putem interakcije s N-terminalnim i C-terminalnim subdomenama dugog lanca. SV2A i SV2B također mogu posredovati vezanje BoNT-A1 i sve tri izoforme su izražene na motornim živčanim završecima (Rosseto i sur., 2014). Glikozilirani ostaci su prisutni na toksin-vezujućim mjestima, a različiti uzorci glikozilacije na različitim tipovima stanica potencijalno mogu objasniti razlike u afinitetu BoNT prema određenim tipovima neurona, odnosno u kliničkoj praksi mogli bi se dovesti u vezu s različitim terapijskim odgovorom kod primjene standardnih doza. Međutim, ovi podaci zahtjevaju daljnja istraživanja.

Syt i SV2 su integralni proteini membrane sinaptičkog vezikula i nisu dostupni za vezanje dok ne dođe do fuzije sinaptičkih vezikula s presinaptičkom membranom što izlaže lumen sinaptičkog vezikula ekstracelularnom okruženju. Stoga, za razliku od PSG, BoNT se veže za te receptore jedino nakon fuzije sinaptičkog vezikula na presinaptičku membranu i čini se da to olakšava idući korak intoksikacije, odnosno endocitozu BoNT (Rosseto i sur., 2014).

### 3.1.3.2. Ulazak u živčane završetke

Drugi korak intoksikacije živčanih završetaka uključuje internalizaciju. Dvostruko vezanje, najprije za PSG, a zatim i s receptorima na membrani sinaptičkih vezikula (Syt ili SV2, ovisno o serotipu toksina kao što je već spomenuto) povećava snagu vezanja BoNT s membranom. Kod vezanja na neurone BoNT-A1 brzo ulazi u prostor sinaptičkih vezikula i broj molekula toksina (ili jedan ili dva) korelira s brojem SV2 molekula u membrani sinaptičkih vezikula. Stupanj ulaska BoNT-A1 korelira sa stupnjem endocitoze sinaptičkih vezikula i sa stupnjem paralize u eksperimentalnim uvjetima ispitivanjima potentnosti BoNT (Rosetto i sur., 2014). Drugim riječima, BoNT koristi sinaptičke vezikule kao model trojanskog konja kako bi ušli u živčane završetke (Slika 5). Suprotno tome, u kulturama neurona internalizacija molekula toksina pri visokim koncentracijama je posredovana preko klatrina i dinamina (Harper i sur., 2011).



**Slika 5.** Ulaz BoNT-A u presinaptički živčani završetak i prikaz mehanizma djelovanja u odnosu na druge serotipove (prilagođeno iz Rosetto i sur., 2014.)

- 1) vezanje karboksilnog kraja domene teškog lanca ( HC-C domena) za poligangliozide (PSG) i SV2 na presinaptičkoj membrani.; 2) endocitoza BoNT-A u sinaptičke mjehuriće uz potrošnju

*ATP-a aktivnošću vezikularne protonske pumpe. Zakiseljavanjem sinaptičkih mjehurića, BoNT-A se protonira što uzrokuje 3) translokaciju lakog lanca iz sinaptičkog mjehurića u citoplazmu. Laki lanac se oslobađa s HN domene djelovanjem tioredoksin reduktaza-tioredoksinog sustava (TrxR–Trx), što cijepa disulfidnu (S-S) vezu; 4) Laki lanac serotipova B, D, F i G cijepaju VAMP, A i E SNAP-25, C cijepa SNAP-25 i sintaksin, što uzrokuje inhibiciju lučenja neurotransmitora.*

### **3.1.3.3. Otpuštanje u citosol**

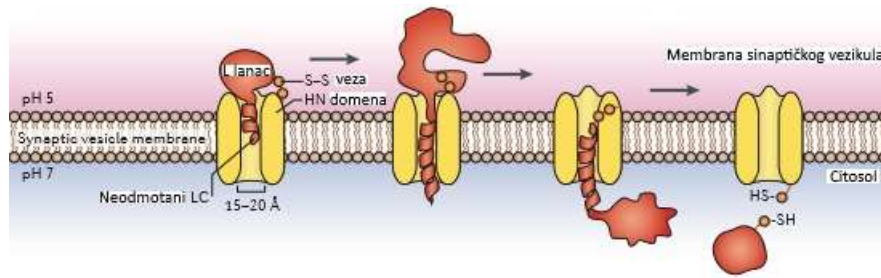
Kako bi dosegla ciljane SNARE proteine u citosolu živčanih stanica, katalitička podjedinica toksina (L lanac) mora se translocirati iz lumena sinaptičkog vezikula u citosol. Osnovni preduvjet za translokaciju L lanca je transmembranski pH gradijent koji se stvara djelovanjem vezikularne ATP protonske pumpe koja uzrokuje ponovni ulazak neurotransmitora u sinaptički vezikul (zajedno s H<sup>+</sup> ionima) nakon egzocitoze. Može se zaključiti da BoNT u procesima ulaska u neurone koristi dva važna fiziološka procesa karakteristična za neurone: jedan je endocitoza sinaptičkih vezikula, a drugi je ponovno punjenje sinaptičkih vezikula neurotransmitorima. Molekularni mehanizmi u pozadini procesa translokacije posljednji su opisani i još uvijek su predmet intenzivnih istraživanja (Rosseto i sur., 2014).

### **3.1.3.4. Translokacija unutar membrane sinaptičkih vezikula**

Poznato je kako BoNT formira kanale male provodljivosti u planarnom lipidnom dvosloju membrane vezikule kod niskog pH i ovaj proces je povezan s translokacijom L lanca, što je istraživano in vitro metodama „patch clamp“ u Neuro2A stanicama i PC12 stanicama. Skupno, studije pokazuju da se smanjenjem pH na cis strani membrane (strana koja je okrenuta prema lumenu sinaptičkog vezikula) potiče prolazak L lanca BoNT-A1 i BoNT-E1 kroz membranu, odnosno kroz kanal koji je 15-20 Å promjera. Kanali ovakvih dimenzija su propusni za  $\alpha$  lance, ali ne i za tercijarne strukture, što sugerira da se L lanac mora odmotati

da bi prošao kroz kanal. Stabilizacija tercijarne strukture L lanca s antitijelima preventivno djeluje na formaciju kanala, što naglašava važnost odmotavanja za translokaciju i također sugerira da je odmatanje povezano s formacijom kanala. Kasnije studije su predložile da sama HN domena nije u mogućnosti formirati transmembranske kanale te da peptidni dio (poveznica) koji povezuje L lanac i H lanac regulira formaciju HN kanala. Otpuštanje L lanca na trans strani (strana prema citosolu) membrane zahtjeva prethodnu redukciju unutarlančane disulfidne veze. Stoga je predložen sljedeći model translokacije (Slika 6): nizak pH lumena sinaptičkih vezikula inducira konformacijske promjene u HN domeni toksina, koja zatim ulazi u membranu i formira translokacijski kanal što prati prolazak djelomično odmotanog L lanca s luminalne strane prema citosolnoj strani membrane sinaptičkog vezikula. L lanac ostaje povezan na sinaptičkom vezikulu sve do redukcije disulfidne veze čime završava ovaj proces. Najnoviji podaci istraživanja su pokazali da se nakon vezanja BoNT za dva receptora na membrani neurona L lanac može translocirati s površine stanice u citosol, i to u nekoliko minuta pri 37 °C u rasponu pH 4,5-6. Čini se da kao pH senzori služe tri karboksilna ostatka s visokim pKa vrijednostima, budući da se njihovom zamjenom odgovarajućim amidima u BoNT/B1 zaobilazi protonacija i omogućuje brži ulazak L lanca u citosol, što može utjecati na povećanje toksičnosti (Rosseto i sur., 2014).

Redukcija unutarlančane disulfidne veze u bilo kojem koraku prije izlaganja citosolu sprječava translokaciju L-lanca, tako da se L-lanac mora pojaviti na citosolnoj strani prije nego dođe do redukcije veze i konačne translokacije. Redukcija disulfidne veze je katalizirana NADPH-tioredoxin reduktazom (Trx-R), čime završava proces translokacije (Rosseto i sur., 2014).

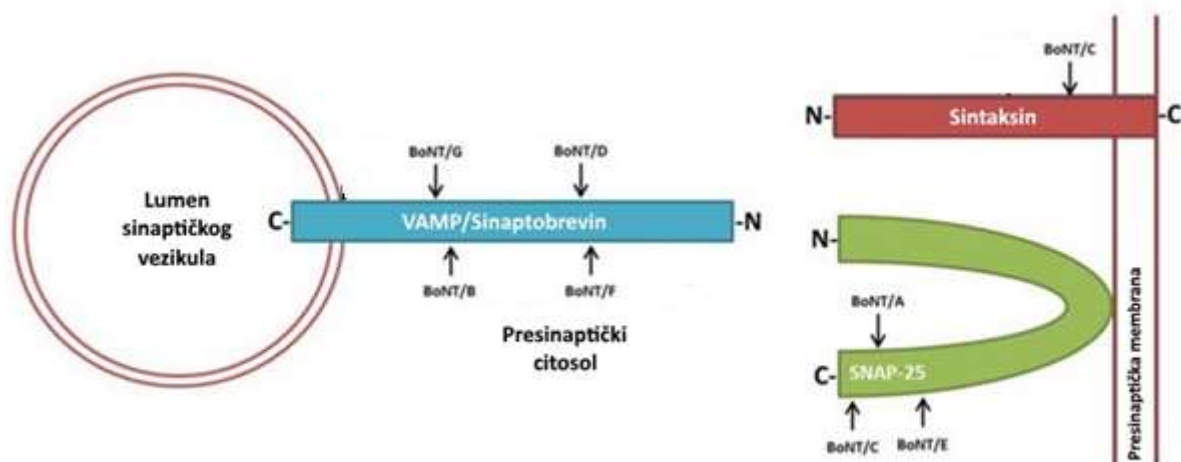


**Slika 6.** Model molekularnih zbivanja tijekom translokacije (prilagođeno iz Rosseto i sur., 2014)

*Model molekularnih zbivanja koji se događa tijekom translokacije L-lanca preko membrane sinaptičkog vezikula a |Na temelju nekoliko biofizičkih studija, predložen je model membranske translokacije L lanca. Zahvaljujući djelovanju vezikularne ATPazne protonske pumpe, pH u lumenu sinaptičkog vezikula postaje kiseo, što uzrokuje konformacijsku promjenu kanala koji prati djelomično odmotan L-lanac preko membrane. Unutarnja disulfidna veza (S-S veza) se reducira na citosolnoj strani membrane sinaptičkog vezikula i posljedično se oslobađa L-lanac u citosol.*

Kratki L lanac svih BoNT su metaloproteaze koje specifično cijepaju jedan ili više SNARE proteina: VAMP (engl. vesicle-associated membrane protein, poznat kao sinaptobrevin), SNAP 25 (engl. synaptosomal-associated protein veličine 25 kDa) ili sintaksin. Na slici 7 pokazano je da BoNT-A specifično cijepa SNAP-25 (9 aminokiselina), kao i tip E i C, koji još cijepa i sinaptotagmin, dok tipovi B, D, G i F cijepaju sinaptobrevin na membrani vezikule. Posljedično tome nastaju nefunkcionalni SNARE proteini koji ne mogu stvarati stabilne komplekse, čime je onemogućena fuzija vezikule s membranom neurona, odnosno lučenje neurotransmitora u sinaptičku pukotinu.





**Slika 7.** Mjesta cijepanja različitih SNARE proteina pomoću sedam serotipova BoNT (od BoNT-A do G) (Prilagođeno iz Tehran i Pirazzini, 2018.)

### 3.1.4. Trajanje djelovanja

Specifično svojstvo botulinum toksina je reverzibilnost djelovanja *in vivo*. Pacijenti s botulizmom se potpuno oporave ako se respiratorna paraliza spriječi mehaničkom ventilacijom. Uslijed injiciranja pikogramskih količina toksina u mišić dolazi do reverzibilne mišićne paralize, odnosno već nakon 4 dana od paralize glavnog motoneurona, dolazi do aksonalnog granjanja (eng., sprouting), tj. izrastanja ogranaka aksona koji mogu preuzeti djelomično ulogu glavnog motoneurona. Tijekom sljedeća 4 tjedna dolazi do povećanja ogranaka, širenja receptivnih polja na mišićnom vlaknu, reorganizacije nikotinskih receptora na postsinaptičkim membranama. Oporavkom glavnog neurona nakon 2 mjeseca od injiciranja, aksonalni ogranci se povlače. Ovakva prilagodba neurona na motornoj ploči može objasniti reverzibilnost paralitičkog djelovanja BoNT-A. Dakle, BoNT ne uzrokuje ireverzibilnu aksonalnu degeneraciju niti u dozama u kojima dolazi do botulizma, već je

vidljiva reverzibilna mišićna atrofiya praćena fenomenom aksonalnog granjanja (Drinovac Vlah, 2017). Postoji razlićitost u vremenu trajanja BoNT inducirane paralize. Vrijeme zadržavanja metaloproteaze unutar citosola živćanog završetka je jedan od glavnih, ali ne i jedini faktor koji utjeće na trajanje paralize. Trajanje paralize ovisi i o vrsti (miš, štakor, ćovjek), aktivnosti zahvaćenog mišića i dozi toksina. Općenito, vrijeme trajanja paralize kod miševa je redom (od najdužeg prema najkraćem trajanju): BoNT-A1, BoNT-C1, BoNT-B1, BoNT-D, BoNT-F1, BoNT-G, BoNT-E1.

Dugotrajnost učinka BoNT je važna kod terapijske primjene, s obzirom da toksin koji ima duže djelovanje zahtjeva rjeđu učestalost primjene te moguće i primjenu nižih doza. Iako, za određena stanja kraće trajanje djelovanja može biti prednost (Rosseto i sur., 2014).

### **3.1.5. Mogući dodatni učinci BoNT-A**

- **Ućinci na egzocitozu iz drugih stanica**

Osim učinka na kolinergićne neurone, pokusi na stanićnim kulturama i izoliranim organima pokazali su da BoNT-A može inhibirati egzocitozu i drugih neurotransmitora, poput serotonina, noradrenalina, dopamina, glutamata, GABA-e, glicina, tvari P, ATP-a i CGRP-a (engl., calcitonin gene-related peptide) (Drinovac Vlah, 2017).

Osim iz neuronalnih sustava, in vitro pokusima je pokazano da BoNT-A može inhibirati lućenje neurotransmitora ovisno o SNAP-25 i iz ne-neuronalnih stanica, poput inhibicije lućenja glutamata iz satelitskih glija stanica, acetilkolina iz Schwanovih i kromafinih stanica te inzulina iz  $\beta$ -stanica gušteraće. Znaćaj ovih nalaza nije jasan, no inhibicija lućenja glutamata iz satelitskih glija stanica mogla bi biti ukljućena u antinociceptivno djelovanje BoNT-A, a inhibicija lućenja acetilkolina iz Schwanovih stanica u regenerativno djelovanje BoNT-A nakon ozljede živca (Drinovac Vlah, 2017).

- **Utjecaj BoNT na ostale fiziološke učinke SNAP-25**

Osim uključenosti u neuroegzocitozu, SNAP-25 protein ima dodatne funkcije, poput regulacije aktivnosti  $Ca^{2+}$  kanala te moguće drugih o naponu ovisnih ionskih kanala; zatim, posredovanje umetanja receptora u plazmatsku membranu, poput TRPV1 i NMDA receptora, ili internalizacije receptora, poput kainatnih receptora te koordinacije lučenja i ponovnog povrata GABA-e modulirajući GAT1 (engl. GABA transporter 1) prijenosnik. Od navedenih učinaka za sada najviše eksperimentalnih dokaza ukazuje da BoNT-A smanjuje ekspresiju TRPV1 receptora (Drinovac Vlah, 2017).

- **Potencijalni učinci BoNT-A koji nisu povezani s cijepanjem SNAP-25**

Postoji nekoliko eksperimentalnih istraživanja na kulturama staničnih linija koje ne ekspimiraju SNAP-25 te na in vivo modelima, u kojima BoNT-A ostvaruje različite učinke ovisno o koncentraciji, poput antitumorskog i proapoptotičkog djelovanja. O farmakološkim učincima BoNT-A koji bi bili neovisni o SNAP-25 proteinu se nedovoljno zna, no ne mogu se u potpunosti isključiti, niti se može sagledati njihovo potencijalno kliničko značenje (Matak i Lacković, 2015).

### **3.2. Formulacije BoNT-A na tržištu**

Pripravci neurotoksina tipa A su u velikoj upotrebi diljem svijeta, pri čemu je najraširenija primjena u estetici za korekciju bora. Statistički podaci Internacionalnog društva za estetsku plastičnu kirurgiju pokazuju da su BoNT-A injekcije najpopularnije od svih invazivnih i neinvazivnih kozmetičkih tretmana u cijelom svijetu. Prema njihovim statistikama u 2017. godini obavljeno je 5 033 693 tretmana s BoNT-A na svjetskoj razini (četvrtina otpada na područje SAD-a), a primjena je u stalnom porastu (ISAPS, 2019).

Tri su formulacije BoNT-A odobrene od strane FDA:

- Onabotulinum toxin A (ONA; Botox<sup>®</sup>/Vistabel<sup>®</sup>; Allergan Inc., Dublin, Ireland)
- Abobotulinum toxin A (ABO; Dysport<sup>®</sup>/Azzalure<sup>®</sup>; Ipsen, Paris, France)
- Incobotulinum toxin A (INCO; Xeomin<sup>®</sup>/Bocouture<sup>®</sup>; Merz Pharmaceuticals GmbH, Frankfurt, Germany) (Samizadeh i De Boulle, 2017).

Njihova je usporedba prikazana u tablici 2.

Tri proizvođača postoje u Koreji i Kini i dostupna su tri branda BoNT-A koji se koriste na području Azije. Medy-Tox (Korea) koja ima tri brenda Meditoxin<sup>®</sup>/Neuronox<sup>®</sup>/Siax<sup>®</sup>, dok Hugel Inc. (Korea) proizvodi tip A BoNT nazvan Botulax<sup>®</sup> (također Zentox<sup>®</sup> ili Regenox<sup>®</sup> u drugim zemljama). Na tržištu postoji i jedan BoNT-B1 (rimabotulinumtoxin B) koji je u upotrebi više od desetljeća, tvorničkog imena Myobloc<sup>®</sup>/Neurobloc<sup>®</sup> (Walker i Dayan, 2014).

**PurTox<sup>®</sup>**. PurTox<sup>®</sup> (Mentor Worldwide LLC, Santa Barbara, California) je novi pročišćeni botulinum toksin tip A za primjenu u dermatologiju. Završena je 3. faza kliničkih ispitivanja i čeka se odobrenje FDA u SAD-u. Najsljedniji je Xeominu<sup>®</sup> (ne sadrži kompleksne proteine) (Walker i Dayan, 2014).

**CBTX-A/Prosigne<sup>®</sup>/Lantox<sup>®</sup>**. CBTX-A (Lanzhou Institute of Biological Products, China) je kineski botulinum toksin tipa A i jedini BoNT-A odobren u Kini. Formuliran je tako da sadrži govedu želatininu da se spriječi prijanjanje neurotoksina na unutrašnjost bočice ili štrcaljke, koji može izazvati neželjene alergijske reakcije ili imunološki odgovor. Ostali preparati koriste humani serum albumin umjesto toga. CBTX-A je dostupan i u Brazilu pod tvorničkim imenom Prosigne<sup>®</sup>, no nije dostupan u SAD-u. Dvostruko slijepa, randomizirana, unakrsna studija koja je uspoređivala Prosigne<sup>®</sup> i Botox<sup>®</sup> u pacijenata sa blefarospazmom i hemifacijalnim spazmom pokazala je sličnu učinkovitost i sigurnosni profil između dva ispitana pripravka BoNT-A (Walker i Dayan, 2014).

**Tablica 2.** Usporedba formulacija BoNT registriranih na tržištu Europe i Sjeverne Amerike. (prilagođeno iz Frevert, 2015).

|   | <b>Botox®/<br/>Vistabel®</b>                         | <b>Dysport®/<br/>Azzalure®</b>                            | <b>Xeomin®/<br/>Bocouture®</b>                              | <b>Neurobloc®/<br/>Myobloc®</b>                      |
|---|--|---|---|--|
| <b>Generičko ime</b>                        | Onabotulinumtoxin A                                  | Abobotulinumtoksin A                                      | Incobotulinumtoksin A                                       | Rimabotulinumtoksin B                                |
| <b>Proizvođač</b>                           | Allergan (SAD)                                       | Ipsen Pharmaceuticals (Francuska)                         | Merz Pharmaceuticals (Njemačka)                             | US WorldMeds(SAD)                                    |
| <b>C.botulinum soj</b>                      | Soj A-hyper  | Soj A   | Soj A (ATCC 3502)   | Bean   |
| <b>Tip toksina</b>                          | A1   | A1  | A1  | B1   |
| <b>MW (PTC)</b>                             | 900 kDa (Da)   | MW nije objavljena (Da)                                   | 150 kDa (Ne)  | MW nije objavljena (Da)                              |
| <b>Farmaceutski oblik</b>                   | Vakuum sušeni prašak za rekonstituciju               | Liofiliziran prašak za rekonstituciju                     | Liofiliziran prašak za rekonstituciju                       | Otopina spremna za uporabu                           |
| <b>Rok trajanja</b>                         | 2-8 °C<br>36 mjeseci                                 | 2-8 °C<br>24 mjeseca                                      | Sobna temperatura<br>36 mjeseci                             | 2-8 °C<br>24 mjeseca                                 |
| <b>pH (rekonstituiran)</b>                  | 7.4  | 7.4   | 7.4   | 5.6  |
| <b>Ekscipijenti</b>                         | U 100 jed u viali:<br>HAS 500µg<br>NaCl 900 µg/viali | U 500 U u viali:<br>HSA 125 µg<br>Laktoza (2,5 mg /viali) | U 100 jed u viali:<br>HAS 1000 µg<br>Sukroza (4,7 µg/viali) | HAS 500 µg/mL<br>Sukcinat 10mM<br>NaCl 100mM         |
| <b>Jedinice (i.j.)/Viala</b>                | 100 i.j. ili 200 i.j.<br>Botox<br>50 i.j. Vistabel   | 300 i.j. ili 500 i.j.<br>Dysport<br>125 i.j. Azzalure     | 50, 100 ili 200 i.j.<br>Xeomin<br>50 i.j. Bocouture         | 2500 i.j. /0,5mL<br>5000 i.j./1mL<br>10.000 i.j./2mL |
| <b>Količina proteina/viala</b>              | 5 ng/100 i.j.  | 4,87 ng/100 i.j.  | 0,44 ng/100 i.j.  | 55 ng/2500 i.j.                                      |
| <b>Klinička aktivnost u odnosu na Botox</b> | 1  | 1:2-1:3   | 1:1   | 1:40-1:50  |

HAS – humani serumski albumin; PTC- *progenitor toxin complex* (nativni kompleks toksina)

Navedeni pripravci BoNT-A na tržištu razlikuju se po sljedećim karakteristikama (Samizadeh i De Boule, 2017.): ukupni sastav - količina neurotoksina i pomoćnih tvari (ekscipijensi); ukupno proteinsko opterećenje; farmaceutski oblik (način dobivanja i rekonstitucije); stabilnost pripravka, pH rekonstituiranog oblika; klinička aktivnost (ekvipotentnost); skladištenje; dostupnost; odobrene indikacije; antigenost (Tablica 2).

Unatoč tome što imaju sličnu kliničku djelotvornost, svaki od ovih neurotoksina je drugačije formuliran, dobiven je različitim proizvodnim procesom i pokazuje jedinstvene karakteristike te posljedično tome pripravci nisu međusobno zamjenjivi (Samizadeh i De Boule, 2017).

Za sigurnu kliničku primjenu i postizanje optimalnih rezultata kod određenih indikacija, liječnik treba razumjeti klinička pitanja poput potentnosti, stupnja konverzije i sigurnosti (širenje toksina s mjesta aplikacije i imunogenost) odabranog pripravka. Učinak BoNT ovisi o mjestu primjene (lokaciji, dubini i veličini mišića u koji se injicira), koncentraciji toksina i volumenu koji se injicira. Posebice je važno voditi računa o ekvipotentnim dozama, pri čemu je stupanj konverzije između Botoxa<sup>®</sup> i Dysporta<sup>®</sup> 1:2-1:4, dok je za Xeomin 1:1.

BoNT-A je najčešće korišten terapijski protein, zahvaljujući širokoj kozmetičkoj primjeni, ali i proširenju terapijske primjene s poremećaja karakteriziranih pretjeranom mišićnom kontrakcijom na hipersekrecijske poremećaje autonomnog živčanog sustava (poput primarne aksilarne hiperhidroze) te na poremećaje karakterizirane bolnom preosjetljivošću (poput migrene). Najviše odobrenih indikacija ima Botox<sup>®</sup> što je i razumljivo s obzirom na dužinu dostupnosti na tržištu. Iako je odobren tek u 11 indikacija, široko se koristi i „*off-label*“, odnosno izvan indikacijskog područja (tablica 3) (Drinovac Vlah, 2017).

**Tablica 3.** Popis kliničkih stanja u kojima se primjenjuje BoNT-A (prilagođeno iz Drinovac Vlah, 2017)

| <b>ŽIVČANO-MIŠIĆNA SPOJNICA</b>   | <b>AUTONOMNE SINAPSE</b>   | <b>SENZORNE SINAPSE</b>  |
|---|--|--|
| <b>ODOBRENA PRIMJENA:</b>   |  |  |
| Strabizam (1989.)   | Primarna aksilarna   | Prevenција kronične migrene  |
| Blefarospazam (1989.)   | hiperhidroza (2010.)   | (2010.)  |
| Hemifacijalni spazam (1990.)  | Urinarna inkontinencija s prekomjernom neurogenom aktivnošću <i>m. detrusora</i> |  |
| Cervikalna distonija (2002.)  | (2011.)  |  |
| Spazam mišića gornjih (2010.) i donjih (2016.)  | Pretjerano aktivan mokraćni mjehur (2011.)                                       |  |
| ekstremiteta kod djece s cerebralnom paralizom i kod odraslih nakon moždanog udara  | Sijaloreja (2019.)   |  |
| Kozmetička primjena: glabelarne linije i lateralne kantalne bore (2002.)  |  |  |
| <b>„OFF-LABEL“ PRIMJENA I U FAZI ISPITIVANJA:</b>   |  |  |
| Ostale fokalne distonije: laringealna, oromandibularna, orolingualna, distonije trupa i udova, profesionalne („writer's cramp“)                                     | Palmarna hiperhidroza<br>Freyjev sindrom<br>Hiperlakrimacija                     | Križobolja<br>Miofascijalni bolni sindrom<br>Piriformis sindrom<br>Kompleksni regionalni bolni sindrom (CPRS)<br>Tenzijska glavobolja<br>Glavobolja kao posljedica prekomjerne primjene lijekova<br>Lateralni epikondilitis<br>Osteoartritis<br>Bol u ramenima<br>Fantomaska i rezidualna bol<br>Neuropatska bol:<br>trigeminalna, postherpetička i dijabetička neuropatija<br>Visceralna bol: kronična bol zdjelice, prostate i mokraćnog mjehura (intersticijski cistitis) |
| Spastičnost udova kod multiple skleroze i ozljeda SŽS   |  |  |
| Esencijalni tremor ruku i glave   |  |  |
| Sindrom ukočene osobe   |  |  |
| Bruksizam   |  |  |
| Poremećaji glatkih mišića: benigna hiperplazija prostate, disinergija mišića zdjelice, ahalazija, analna fisura, disfunkcija Oddijevog sfinktera, Raynoudov fenomen |  |  |
| Kozmetička primjena: hipertrofične bore platizme  |  |  |

### 3.3. Usporedba BoNT-A

#### 3.3.1. Potentnost

U svakom sažetku opisa svojstava za tri registrirana pripravka s BoNT-A u Republici Hrvatskoj je navedeno da određeni pripravak nije zamjenjiv s drugim zbog razlika u potentnosti. Također, različiti pripravci BoNT-A razlikuju se u odnosu na sastav netoksičnih proteina, količinu biološki aktivnog dijela molekule, kao i njegovu specifičnu potentnost (tablica 4).

Biološka potentnost BoNT-A pripravaka temeljila se na određivanju LD50. Pri tome je 1 jedinica toksina definirana kao LD50 za miša, tj. doza toksina koja nakon intraperitonealne primjene dovodi do smrti 50% tretiranih miševa. Svaki proizvođač za svoj pripravak utvrđuje LD50, pri čemu postoje određene razlike u korištenim otapalima i standardima. Danas se LD50 test zamjenjuje s testovima na stanicama, pri čemu svaki proizvođač razvija vlastitu staničnu liniju i protokol za utvrđivanje potentnosti.

Tako je koristeći ELISA (eng., *enzyme-linked immunoadsorbent assay*) metodu pokazano da 1 internacionalna jedinica za INCO odgovara 0,44 ng; za ONA 0,73 ng, a za ABO 0,65 ng toksina. Specifična potentnost nerotoksina ili biološka aktivnost neurotoksina (i.j.) po masi proteina daje INCO najveću specifičnu biološku aktivnost od 227 i.j./ng, u usporedbi s 137 i.j./ng za ONA i 154 i.j./ng za ABO.

Kliničkom usporedbom pokazana je slična aktivnost 0,44 ng INCO i 0,73 ng ONA. Postoji hipoteza da dio neurotoksina kod ONA može biti inaktivan ili denaturiran s obzirom na specifični proces sušenja vakuumom tijekom procesa proizvodnje gotovog pripravka (Frevert, 2015). Dakle, postoje određene razlike među tri komercijalno dostupna BoNT-A



pripravka što ne dozvoljava njihovu izravnu usporedbu već naglašava važnost kliničkih studija i utvrđivanja faktora konverzije *head-to-head* u kliničkom okruženju.

**Tablica 4.** Pripravci botulinum toksina i sadržaj proteina/100 internacionalnih jedinica (prilagođeno iz Frevert, 2015)

| Lijek                         | Količina 150-kDa komponente* (ng) | Ukupna količina proteina (150 kDa i NAP) (ng) | Ekvivalentna doza | Specifična potentnost neurotoksina (i.j./ng) |
|-------------------------------|-----------------------------------|---|-------------------|--|
| <b>Onabotulinum</b> toksin A  | 0,73                              | 5,00  | 1                 | 137  |
| <b>Incobotulinum</b> toksin A | 0,44                              | 0,44  | 1                 | 227  |
| <b>Abobotulinum</b> toksin A  | 0,65                              | 4,87  | 2-3               | 154  |

NAP-netoksični dodatni proteini

\*utvrđeno visoko osjetljivom metodom ELISA (enzyme linked immunoadsorbent assay)

Nekoliko kliničkih studija su pokazale usporedivu kliničku učinkovitost INCO s ONA, zbog čega je dogovorena stopa konverzije 1:1. Studije su također pokazale slične rezultate u početku djelovanja, duljini djelovanja i sigurnosnom profilu. U slučaju konverzije između ABO i ONA, omjer 2-3 i.j. ABO odgovaraju po potentnosti 1 i.j. ONA te je dogovorena stopa konverzije ONA: ABO 1:2,5 (Frevert, 2015).

Međutim, kod usporedbe ONA (ili INCO) s ABO u literaturi je opisano korištenje širokog raspona konverzijskih faktora, od 1:1 pa sve do 1:11, što je odraz različite kliničke prakse gdje liječnik određuje broj apliciranih mišića i početnu dozu s obzirom na stanje pacijenta i ciljeve liječenja. Što točnija procjena konverzijskog faktora trebala bi osigurati točniju usporedbu učinkovitosti i sigurnosti trenutno dostupnih pripravaka BoNT-A s obzirom na kvalitativnu i kvantitativnu sličnu djelotvornost kod ekvipotentnih doza (Scaglione, 2016).

### **3.3.2. Molekularna masa i kompleksni proteini**

Molekularna masa i sadržaj kompleksnih proteina različitih pripravaka BoNT-A je drugačiji. Kompleksna struktura specifična je ovisno o izvoru toksina (soj i metoda uzgoja bakterija te metoda izolacije i pročišćavanja toksina). Aktivni protein u svim komercijalnim pripravcima je veličine 150 kDa, amino kiselinska sekvenca je identična u ONA i INCO, a vjerojatno i kod ABO (premda nema podataka) s obzirom da su u sva tri slučaja toksini izolirani iz Hall soja *C.botulinum*. Netoksični proteini sastoje se od nekoliko hemaglutininskih proteinskih komponenti i jednog nehemaglutininskog lanca, a kao što je prethodno rečeno, važni su kod oralnog trovanja toksinom jer štite toksični dio kompleksa od razgradnje u GIT-u. Ne-toksični progenitorski kompleks proteina je veličine 900 kDa u ONA, dok za ABO nema točnih podataka o veličini tog kompleksa. Međutim, čini se da prevladava molekula veličine 300 kDa. INCO se razlikuje od ONA i ABO u tome što ne sadrži kompleksne proteine već samo neurotoksični dio veličine 150 kDa koji je odgovoran za terapijski učinak. Važno je napomenuti da molekularna masa ili veličina kompleksa ne utječu na biološku aktivnost i farmakološka svojstva proteina, jer neurotoksična komponenta BoNT-A brzo disocira od kompleksnih proteina (ako je prisutan) nakon razrjeđivanja, sušenja i rekonstitucije liofilizata, uz >85% neurotoksina prisutnog u slobodnom obliku od 150 kDa prije injiciranja u ciljno tkivo (Frevert, 2015).

### **3.3.3. Proces proizvodnje i rekonstitucije**

Točni podaci o proizvodnom procesu su u vlasništvu kompanije, ali proces pročišćavanja kao prvi korak uključuje taloženje za svaki komercijalni pripravak. ONA je pročišćavan

ponovljenim taloženjem i otapanjem, dok je ABO dobiven pročišćavanjem putem kolonske kromatografije. Tijekom proizvodnje INCO, kompleksni proteini su uklonjeni. Ovaj postupak se odvija u serijama kromatografskih postupaka kako bi se minimalizirao sadržaj inaktivnih proteina i kako bi se spriječila moguća denaturacija, degradacija i gubitak biološke aktivnosti. Tri komercijalna pripravka BoNT-A o kojima govorimo su dobivena ili vakuumskim sušenjem ili postupkom liofilizacije. Ekscipijenti (NaCl ili sukroza ili laktoza) su dodani kako bi smanjili rizik inaktivacije produkta tijekom proizvodnog procesa i dugotrajnog skladištenja, a humani serumski albumin u svim pripravcima je potreban za stabilizaciju BoNT-A, ali služi i kao krioprotektant tijekom procesa liofilizacije te može služiti kako bi spriječio adsorpciju ostalih proteina (Rowe i sur., 2009). ONA se otapa u otopini koja sadrži NaCl i albumin prije sušenja vakuumom, za što se misli da negativno utječe na aktivnost neurotoksina i može biti odgovorno za sadržaj toksoida (inaktivni neurotoksin). Iz kliničke perspektive, premda inaktivni neurotoksin ne djeluje na neurone, može biti prepoznat od strane imunskog sustava. Liječnici trebaju biti upoznati da suboptimalna rekonstitucija BoNT-A pripravaka može smanjiti njihovu učinkovitost (Frevert, 2015).

#### **3.3.4. Stabilnost**

U komercijalnim formulacijama humani serumski albumin (HSA) je potreban za stabilizaciju BoNT-A te da bi se spriječilo njegovo prianjanje na unutrašnjost bočice ili štrcaljke, pri čemu ABO sadrži najmanju količinu (0,125 mg), u odnosu na 0,5 mg HSA u ONA, odnosno 1 mg HSA u INCO pripravcima dok su pomoćne tvari (laktoza, natrijev-klorid i sukroza) dodane kako bi smanjili rizik inaktivacije toksina tijekom proizvodnog procesa i dugotrajnog skladištenja. Pripravci s ABO imaju rok trajanja od 2 godine na 2-8 °C, pripravci s ONA mogu biti pohranjeni 2 ili 3 godine na 2-8 °C (ovisno o broju jedinica) ili u zamrzivaču, a oni s INCO imaju rok trajanja od 3 ili 4 godine na sobnoj temperaturi. Nakon rekonstitucije, ONA

i INCO su stabilni 24 h na 2-8 °C, a ABO 4 h na 2-8 ° C. Produženi rok trajanja i manje stroga ograničenja temperature za INCO sugeriraju da kompleksni proteini nisu potrebni za stabilnost BoNT-A. Među tri BoNT-A pripravka, INCO je jedini koji je stabilan u liofiliziranom obliku do 4 godine na sobnoj temperaturi, dok pripravci ONA i ABO moraju biti pohranjeni u hladnjaku. U istraživanju o stabilnosti uslijed različitih promjena uvjeta u okruženju, INCO je je pokazao održanu stabilnost i zadržanu potentnost i uslijed skladištenja pri visokim temperaturama od 60°C 1 mjesec (Scaglione, 2016).

### **3.3.5. Širenje i difuzija toksina**

Širenje toksina opisuje učinak toksina na područja udaljena od mjesta aplikacije, što može povećati rizik od neželjenih učinaka. Na primjer, širenje toksina od mjesta aplikacije u cervikalnu ili kraniofacijalnu muskulaturu može izazvati pojavu diplopije, disartije ili disfagije. Iako je rijetka pojava, daljnje širenje može izazvati nenamjernu neuromuskularnu blokadu na anatomskim strukutrama koje su udaljene od mjesta aplikacije. Na primjer, simptomi sistemskog botulizma kao što je disfagija mogu se pojaviti kada je toksin injiciran na udaljeno mjesto (npr. donji ekstremiteti kod spasticiteta) (Yiannakopoulou, 2015). Potencijalni rizik za nuspojave uslijed širenja toksina je naveden u svakom sažetku opisa svojstava lijeka.

Bilo koja moguća razlika među pripravcima BoNT u svojstvu širenja toksina s mjesta primjene te posljedično djelovanju i denervacijskog područja mogla bi biti klinički relevantna. Premda su razlike u potencijalu širenja toksina s mjesta aplikacije promatrane u kliničkim studijama, za sada nema dokaza koji bi istaknuo korist određenog pripravka pred ostalima. Bilo je uvriježeno mišljenje da je difuzija neurotoksina u okolno tkivo sporija kod pripravaka s većom molekulskom masom (ONA; 900 kDa) nego kod onih koji imaju nižu (ABO) ili su

bez kompleksnih proteina (INCO, 150 kDa), međutim, novije studije to ne dokazuju, što je pokazano i ispitivanjima na životinjama. Osim toga, poznato je da većina kompleksnih netoksičnih proteina disocira vrlo brzo nakon rekonstitucije liofilizata, odnosno prije injiciranja u tkivo. Faktori za koje se smatra da mogu utjecati na potencijalno širenje neurotoksina su, između ostalog i doza, koncentracija otopala, tehnika aplikacije, mjesto aplikacije, razina mišićne hiperaktivnosti, dubina injekcije te korištenje post-injekcijske masaže (Scaglione, 2016).

### **3.3.6. Imunogenost**

Važan razlog razvoja sekundarne neučinkovitosti liječenja s bilo kojim terapijskim proteinom je njegova neutralizacija stvorenim protutijelima. Protutijela koja postepeno smanjuju ili u potpunosti blokiraju farmakološki učinak (neutralizirajuća ili blokirajuća protutijela) nastaju na specifične proteinske antigene nakon aktivacije imunološke reakcije organizma, posebice nakon ponavljane primjene proteina (Roggenkamper i sur., 2005).

Za razliku od drugih bioloških pripravaka, BoNT-A ima niski stupanj imunogenosti, što se potvrđuje niskim titrom protutijela, čak i pri višekratno ponavljanoj primjeni. Osim ukupne aplicirane doze i broja ponavljanih aplikacija, na imunogenost mogu utjecati i čimbenici povezani sa samim pripravkom, kao što su proizvodni proces, te opterećenje netoksičnim proteinima (Frevert 2015, Grein i sur., 2011).

Preklinički podaci pokazali su da, za razliku od ONA i ABO, INCO ne vodi do nastanka neutralizirajućih protutijela nakon ponovljenih injekcija kod novozelandskih bijelih zečeva. Kukreja i suradnici su izmjerili imunološku reaktivnost BoNT-A u čistom i kompleksnom obliku pri čemu je pokazano da je BoNT-A s kompleksnim proteinima (uključujući HA-33) potiče jači imunološki odgovor od samog pročišćenog neurotoksina. Poznato je da

hemaglutinini djeluju kao adjuvansi i mogu vezati i aktivirati dendritičke stanice koje igraju ključnu ulogu u ranoj fazi imunološkog odgovora. To se posebice odnosi na HA-33 kao najveću komponentu kompleksnih proteina i glavni imunoreaktivni protein u BoNT-A kompleksu. Na liniji stanica neuroblastoma (SH-SY5Y) Wang i suradnici su 2014. pokazali da različiti pripravci BoNT-A mogu izazvati različit odgovor. Premda se čisti BoNT-A, BoNT-A kompleks te NAP svi vežu na neuronske stanice, BoNTA kompleks i NAP dodatno su vezani i za limfoblaste i fibroblaste. Nadalje, u istoj studiji čisti BoNT-A nije utjecao na otpuštanje upalnih citokina iz neurona, za razliku od ostala dva pripravka koji su povećali oslobađanje više upalnih citokina. Štoviše, profil izlučenih citokina je različit, što upućuje na to da različita struktura kompleksa BoNT-A inducira značajno različit odgovor domaćina (Wang i sur., 2014).

Titar protutijela koji izaziva rezistenciju na farmakološko djelovanje BoNT-A još nije definiran te imunogeni odgovor može varirati od pacijenta do pacijenta. Osim toga, samo protutijela stvorena na aktivni dio neurotoksina (150 kDa) neutraliziraju djelomično ili potpuno njegovu biološku aktivnost i klinički će dovesti do neuspjeha liječenja.

Danas pacijenti kojima se primjenjuje BoNT-A u estetske svrhe započinju s tretmanom koji nastavljaju s ponavljanom aplikacijom istih ili većih ukupnih doza, a upravo bi ponavljana primjena i visoke ukupne doze mogle biti najvažniji čimbenik za razvoj neutralizirajućih protutijela. Prema za sada dostupnim podacima, incidencija nastanka neutralizirajućih protutijela je između 0,3 i 6%, Dressler i suradnici su u literaturi opisali jedan slučaj prekida terapije uvjetovan razvojem neutralizirajućih protutijela kod terapije s INCO i to kod pacijenta s progresivnom hereditarnom juvenilnom generaliziranom distonijom kod kojeg je imunološki sustav već bio senzitiviran prijašnjom primjenom ABO kroz 15 godina (Dressler i sur., 2014). Nadalje, u prospektivnoj dvostruko slijepoj studiji Hefter i suradnici su na 37 pacijenata s cervikalnom distonijom prethodno liječenim s ONA i ABO koji su već razvili

neutralizirajuća protutijela i sekundarnu neučinkovitost, primjenili INCO koji je doveo nakon 24 mjeseca do pada titra protutijela kod 84% pacijenata, a njih 62% je postalo seronegativno.

Osim odabira proizvoda s niskim rizikom od antigenosti, važno je uspostaviti dobru praksu kako bi se smanjio rizik od stvaranja neutralizirajućih protutijela. Istraživanja s pripravcima BoNT-A koji sadrže kompleksne proteine sugeriraju da veća učestalost doziranja, kratki intervali liječenja i veći broj injekcija mogu povećati vjerojatnost razvoja neutralizirajućih protutijela. Iz tog razloga većina stručnjaka trenutno preporučuje korištenje najmanjih doza koje postižu željeni klinički učinak, izbjegavanje primjene „booster“ doza i čekanje najmanje 3 mjeseca između tretmana (Albreicht i sur., 2019).

### **3.4. Klinička usporedba tri pripravka botulinum toksina tipa A**

#### **3.4.1. Onabotulinum toksin (Botox®)**

Jedna bočica sadrži botulinski toksin tipa A iz *Clostridium botulinum* tip A (soj Hall), 100 Allergan jedinica u bočici. Pomoćne tvari su humani albumin i natrijev klorid.

Lijek se preporučuje čuvati u hladnjaku (2-8°C) ili zamrzivaču (na ili ispod -5°C).

Mikrobiološka ispitivanja i ispitivanja vrijednosti pokazala su da proizvod nakon rekonstitucije može biti čuvan do 5 dana na temperaturi od 2 °C do 8 °C. S mikrobiološkog stanovišta, lijek treba primijeniti odmah (HALMED, 2019).

##### **3.4.1.1. Terapijske indikacije i doziranje**

Botox je indiciran za liječenje neuroloških poremećaja: fokalnog spasticiteta povezanog s dinamičkim ekvinus deformitetom stopala zbog spasticiteta u ambulantnih pedijatrijskih bolesnika s cerebralnom paralizom u dobi od 2 godine i starijih; fokalnog spasticiteta ručnog zgloba i šake te gležnja u odraslih bolesnika nakon moždanog udara.

Točno doziranje i broj mjesta injiciranja moraju se prilagoditi individualno prema veličini, broju i lokaciji zahvaćenih mišića, težini spasticiteta, prisutnosti lokalne mišićne slabosti i odgovoru bolesnika na prethodno liječenje.

Maksimalna ukupna doza bila je u kontroliranim i otvorenim nekontroliranim kliničkim studijama 200 i 240 jedinica Botox-a podijeljenih između odabranih mišića po tretmanu. Ponovljeno injiciranje ne smije biti u razmaku manjem od 12 tjedana (HALMED, 2019).

#### Blefarospazam, hemifacijalni spazam i povezane fokalne distonije

Početna preporučena doza je 1,25 do 2,50 jedinica koja se injicira u medijalni i lateralni dio orbicularis oculi gornje vjeđe i lateralni dio orbicularis oculi donje vjeđe. Ako spazam u sljedećim područjima ometa vid, ona mogu biti dodatna mjesta gdje se može injicirati, a to su područje obrva, lateralni dio orbicularisa ili gornje područje lica. Početna doza ne smije biti veća od 25 jedinica po oku. Ukupna doza primijenjena kod blefarospazma ne smije biti veća od 100 jedinica svakih 12 tjedana (HALMED, 2019).

#### Cervikalne distonije (spazmodični tortikolis)

U prvom terapijskom tretmanu ne smije se sveukupno primijeniti više od 200 jedinica, sa stupnjevitom prilagodbom u sljedećim terapijskim tretmanima ovisno o početnom odgovoru. Ne smije se primijeniti doza veća od 50 jedinica na jedno mjesto. Za sternomastoidni mišić doza ne smije biti veća od 100 jedinica. Da bi se što više smanjila incidencija disfagije, u sternomastoidni se mišić ne smije injicirati bilateralno. Ne smije se prekoračiti ukupna doza od 300 jedinica po jednom tretmanu. Optimalan broj mjesta injiciranja ovisi o veličini mišića. Ne preporučuju se tretmani u razmacima manjim od 10 tjedana (HALMED, 2019).



### Kronična migrena

Olakšavanje simptoma kod odraslih koji ispunjavaju kriterije za kroničnu migrenu (glavobolje  $\geq 15$  dana u mjesecu od kojih je najmanje 8 dana s migrenom) u bolesnika kod kojih nema adekvatnog odgovora ili koji ne podnose lijekove za profilaksu migrene.

Preporučena doza je 155 jedinica do 195 jedinica intramuskularno (i.m.) kao injekcije od 0,1 ml (5 jedinica) na 31 do 39 mjesta (HALMED, 2019).

### Poremećaj mokraćnog mjehura:

U odraslih bolesnika s urinarnom inkontinencijom s prekomjernom neurogenom aktivnošću detruzora nastalom kao posljedica neurogenog mokraćnog mjehura uslijed stabilne supcervikalne ozljede leđne moždine ili multiple skleroze preporučena doza je 100 jedinica Botox-a kao injekcija 0,5 ml (5 jedinica) na 20 mjesta u detruzor.

U odraslih bolesnika s idiopatskom prekomjernom aktivnosti mokraćnog mjehura sa simptomima urinarne inkontinencije, hitnosti i učestalog mokrenja u odraslih bolesnika kod kojih nema adekvatnog odgovora na liječenje antikolinergičkim lijekovima ili koji ne podnose takve lijekove preporučena doza je 200 jedinica Botox-a, kao injekcije od 1 ml (~ 6,7 jedinica), na 30 mjesta u detruzor (HALMED, 2019).

### Poremećaja kože i kožnih privjesaka: trajne i teške primarne hiperhidroze aksile, koja ometa svakodnevne aktivnosti, a rezistentna je na topičko liječenje.

Preporučene doze su da se intradermalno injicira 50 Botox jedinica, ravnomjerno raspoređenih na više mjesta primjene u približnim razmacima od 1 do 2 cm unutar hiperhidroznog područja svake aksile. Maksimalna ukupna doza veća od 50 Botox jedinica po aksili se ne preporuča. Injiciranja se ne smiju ponavljati češće od svakih 16 tjedana (HALMED, 2019).

### 3.4.1.2. Nuspojave (vrlo česte i česte)

Premda su nuspojave kod primjene BoNT-A rijetke, blage i prolazne, ipak se javljaju u oko 35% bolesnika s blefarospazmom, 28% s cervikalnom distonijom, 17% s dječjom cerebralnom paralizom, 11% s primarnom hiperhidrozom, 16% s fokalnim spasticitetom udova povezanim s moždanim udarom, 26% kod prvog liječenja kod kronične migrene, pa do 30 % kod urinarne inkontinencije zbog prekomjerne neurogene aktivnosti detruzora. Sukladno mehanizmu djelovanja i načinu te mjestu primjene, očekivane nuspojave su lokalna mišićna slabost te bol i reakcija na mjestu injiciranja. Rijetko se javljaju sistemske opasne nuspojave, poput disfagije, paralize respiratornih mišića, anafilaktine reakcije (Yiannakopoulou, 2015).

Vrlo česte nuspojave se javljaju u više od 1 od 10, a česte u 1-10 na 100 pacijenata (tablica 5) (HALMED, 2019).

**Tablica 5.** Nuspojave (česte i vrlo česte) (prilagođeno iz HALMED, 2019)

| Nuspojave  | Učestalost        |
|--|-------------------|
| <b>Fokalni spasticitet povezan s dječjom cerebralnom paralizom</b> |                   |
| Virusne infekcije, infekcije uha                                   | <i>Vrlo često</i> |
| Pospanost, poremećaji hoda, parestezija                            | <i>Često</i>      |
| Osip   | <i>Često</i>      |
| Mijalgija, mišićna slabost, bol u ekstremitetu                     | <i>Često</i>      |
| Urinarna inkontinencija  | <i>Često</i>      |
| Pad  | <i>Često</i>      |
| Malaksalost, bol na mjestu injekcije, astenija                     | <i>Često</i>      |
| <b>Fokalni spasticitet povezan s moždanim udarom</b>               |                   |
| Hipertonija  | <i>Često</i>      |

|   |            |
|---|------------|
| Ekhimioza, purpura  | Često      |
| Bol u ekstremitetima i slabost mišića   | Često      |
| Bol na mjestu injekcije, vrućica, bolest slična gripi, hemoragija na mjestu injekcije, iritacija na mjestu injiciranja      | Često      |
| <b>Blefarospazam, hemifacijalni spazam i distonije</b>  |            |
| Ptoza vjeđa   | Vrlo često |
| Točkasti keratitis, lagofthalmus, suhe oči, preosjetljivost na svjetlost, pojačano suženje očiju                            | Često      |
| Ekhmioza  | Često      |
| Iritacija, edem lica  | Često      |
| <b>Cervikalna distonija</b>   |            |
| Rinitis, infekcija gornjih dišnih putova  | Često      |
| Omaglica, hipertonija, hipoestezija, somnolencija, glavobolja   | Često      |
| Disfagija   | Vrlo često |
| Suha usta, mučnina  | Često      |
| Mišićna slabost   | Vrlo često |
| Koštano-mišićna ukočenost, bolnost  | Često      |
| Bol   | Vrlo često |
| Astenija, bolest slična gripi, malaksalost  | Često      |
| <b>Kronična migrena</b>   |            |
| Glavobolja, migrena, pareza lica  | Često      |
| Ptoza vjeđa   | Često      |
| Svrbež, osip  | Često      |
| Bol u vratu, mialgija, bol u kostima i mišićima, mišićno-koštana ukočenost, grčevi mišića, slabost mišića, ukočenost mišića | Često      |
| Bol na mjestu injekcije   | Često      |
| <b>Prekomjerno aktivan mokraćni mjehur</b>  |            |
| Infekcije urinarnog trakta  | Vrlo često |

|  |                   |
|--|-------------------|
| Bakteriurija   | <i>Često</i>      |
| Dizurija   | <i>Vrlo često</i> |
| Urinarna retencija, volumen ostatnog urina, polakiurija, leukociturija   | <i>Često</i>      |
| <b>Urinarna inkontinencija zbog prekomjerne neurogene aktivnosti detruzora</b>   |                   |
| Infekcije urinarnog trakta   | <i>Vrlo često</i> |
| Nesanica   | <i>Često</i>      |
| Konstipacija   | <i>Često</i>      |
| Mišićna slabost, grčevi u mišićima   | <i>Često</i>      |
| Retencija urina  | <i>Vrlo često</i> |
| Hematurija, dizurija, divertikul mokraćnog mjehura   | <i>Često</i>      |
| Umor, poremećaj hoda   | <i>Često</i>      |
| Autonomna disrefleksija, pad   | <i>Često</i>      |
| <b>Primarna aksilarna hiperhidroza</b>   |                   |
| Glavobolja, parestezija  | <i>Često</i>      |
| Valovi vrućine   | <i>Često</i>      |
| Hiperhidroza (znojenje izvan aksile), neugodan miris kože, svrbež, supkutani čvorovi, alopecija  | <i>Često</i>      |
| Bol u ekstremitetu   | <i>Često</i>      |
| Bol na mjestu injekcije  | <i>Vrlo često</i> |
| Bol, edem na mjestu injiciranja, krvarenje na mjestu injiciranja, preosjetljivost na mjestu injiciranja, iritacija na mjestu injekcije, astenija, reakcije na mjestu injekcije | <i>Često</i>      |

### 3.4.2. Abobotulinum toksin (Dysport®)

Jedna bočica sadrži 500 internacionalnih jedinica Clostridium botulinum neurotoksina tipa A sa hemaglutininskim kompleksom. Lijek se treba čuvati pri temperaturi između 2 i 8°C i ne

smije se zamrzavati. Rekonstituirana otopina pri temperaturi 2 i 8°C, unutar 24 sata zadržava svoju kemijsku i fizikalnu stabilnost. Pomoćne tvari su humani albumin i laktoza (CBZ, 2019).

### 3.4.2.1. Terapijske indikacije i doziranje

Dysport® je indiciran za liječenje različita stanja karakteriziranih hiperkontraktilnošću mišića, a ovisno o mjestu injiciranja i veličini mišića, različito je doziranje (Tablica 6 – 8)

#### Simptomatsko liječenje fokalnog spasticiteta gornjih udova u odraslih

**Tablica 6.** Doziranje po mišićima kod fokalnog spasticiteta gornjih udova u odraslih

| <b>Mišić</b>                         | <b>Preporučena doza<br/>DYSPOORT (i.j.)</b> |
|--------------------------------------|---|
| Flexor carpi radialis (FCR)          | 100-200 i.j.                                |
| Flexor carpi ulnaris (FCU)           | 100-200 i.j.                                |
| Flexor digitorum profundus (FDP)     | 100-200 i.j.                                |
| Flexor digitorum superficialis (FDS) | 100-200 i.j.                                |
| Flexor Pollicis Longus               | 100-200 i.j.                                |
| Adductor Pollicis                    | 25-50 i.j.                                  |
| Brachialis                           | 200-400 i.j.                                |
| Brachioradialis                      | 100-200 i.j.                                |
| Biceps Brachii (BB)                  | 200-400 i.j.                                |
| Pronator Teres                       | 100-200 i.j.                                |
| Triceps Brachii                      | 150-300 i.j.                                |
| Pectoralis Major                     | 150-300 i.j.                                |
| Subscapularis Latissimus Dorsi       | 150-300 i.j.<br>150-300 i.j.                |

## Simptomatsko liječenje fokalnog spasticiteta donjih udova s deformacijom stopala

**Tablica 7.** Doziranje po mišićima kod fokalnog spasticiteta donjih udova

| <b>Mišić</b>            | <b>Preporučena doza<br/>DYSPOORT (i.j.)</b> | <b>Broja mjesta injektiranja<br/>po mišiću</b> |
|-------------------------|---|--|
| Soleus muscle           | 300-500 i.j.                                | 2-4  |
| Gastrocnemius           |   |  |
| Medijalna glava         | 100-450 i.j.                                | 1-3  |
| Lateralna glava         | 100-450 i.j.                                | 1-3  |
| Tibialis posterior      | 100-250 i.j.                                | 1-3  |
| Flexor digitorum longus | 50-200 i.j.                                 | 1-2  |
| Flexor digitorum brevis | 50-200 i.j.                                 | 1-2  |
| Flexor hallucis longus  | 50-200 i.j.                                 | 1-2  |
| Flexor hallucis brevis  | 50-200 i.j.                                 | 1-2  |

### Spazmodični tortikolis u odraslih

Inicijalna preporučena doza je 500 jedinica, koja treba biti podijeljena i injektirana u 2 ili 3 najviše aktivna mišića. U daljnim aplikacijama, preporučene doze su između 250-1000 jedinica te je maksimalna preporučena doza 1000 jedinica. Aplikacija bi se trebala ponoviti otprilike svakih 16 tjedana ali ne češće od 12 tjedana (CBZ, 2019).

Deformacija stopala uslijed cerebralne paralize kod pedijatrijske populacije iznad 2 godine

**Tablica 8.** Doziranje po mišićima kod cerebralne paralize kod pedijatrijske populacije iznad 2 godine

| <b>Mišić</b>       | <b>Preporučena doza<br/>DYSPOORT (i.j.)</b> | <b>Broja mjesta injektiranja<br/>po mišiću</b> |
|--------------------|---|--|
| Gastrocnemius      | 5-15 i.j./kg                                | Do 4   |
| Soleus             | 4-6 i.j./kg                                 | Do 2   |
| Tibialis posterior | 3-5 i.j./kg                                 | Do 2   |

Blefarospazam i hemifacijalni spazam u odraslih

Kod liječenja bilateralnog blefarospazma preporučena inicijalna doza je 40 jedinica po oku.

Kod liječenja blefarospazma i hemifacijalnog spazma makismalna doza ne smije prijeći 120 jedinica po oku (CBZ, 2019).

Simptomatsko liječenje trajne primarne hiperhidroze aksile, koja utječe na izvršavanje aktivnosti u svakodnevnom životu i rezistentna je na topikalno liječenje

Makismalna doza ne smije prijeći 200 jedinica po aksili. Preporučena inicijalna doza je 100 jedinica po aksili (CBZ, 2019).

### 3.4.2.1. Nuspojave (vrlo česte i česte )

**Tablica 9.** Nuspojave (česte i vrlo česte) prema indikacijama (prilagođeno prema CBZ, 2019).

| Nuspojave   | Učestalost        |
|---|-------------------|
| <b>Općenito</b>   |                   |
| Lokalna mišićna slabost   | <i>Često</i>      |
| Astenija, umor, simptomi slični gripi, bol/svrbež na mjestu aplikacije                          | <i>Često</i>      |
| <b>Simptomatsko liječenje fokalnog spasticiteta u odraslih</b>                                  |                   |
| Mišićna slabost, mišićno-koštana bol, bol u ekstremitetima                                      | <i>Često</i>      |
| Reakcija na mjestu primjene (npr. bol, eritem, otekline), astenija, umor, simptomi slični gripi | <i>Često</i>      |
| Disfagija   | <i>Često</i>      |
| Pad   | <i>Često</i>      |
| <b>Spamazmodični tortikolis</b>   |                   |
| Glavobolja, vrtoglavica, facijalna pareza   | <i>Često</i>      |
| Zamagljenje vida, smanjena oštrina vida   | <i>Često</i>      |
| Disfonija i dispneja  | <i>Često</i>      |
| Disfagija, suha usta  | <i>Vrlo često</i> |
| Mišićna slabost   | <i>Vrlo često</i> |
| Križobolja, mišićno-koštana bol, mijalgija, bol u udovima, mišićno-koštana ukočenost            | <i>Često</i>      |
| <b>Spasticitet nogu uslijed cerebralne paralize kod djece</b>                                   |                   |
| Urinarna inkontinencija   | <i>Često</i>      |
| Simptomi slični gripi, reakcija na mjestu primjene, poremećaji hoda, umor                       | <i>Često</i>      |
| Pad   | <i>Često</i>      |
| <b>Blefarospazam i hemifacijalni spazam</b>   |                   |



|  |                   |
|--|-------------------|
| Facijalna pareza                                   | <i>Često</i>      |
| Ptoza  | <i>Vrlo često</i> |
| Edem vjeđa   | <i>Često</i>      |
| <b>Aksilarna hiperhidroza</b>                      |                   |
| Dispneja   | <i>Često</i>      |
| Znojenje   | <i>Često</i>      |
| Bol u ramenu, ruci i vratu, mialgija ramena i kože | <i>Često</i>      |

### 3.4.3. Incobotulin A (Xeomin<sup>®</sup>)

Jedna bočica sadrži 100 jedinica Clostridium botulinum neurotoksina tipa A (150 kD), ne sadrži proteinske komplekse (Botulinski neurotoksin tip A, pročišćen iz kultura Clostridium botulinum (soj Hall)). Pomoćne tvari su humani albumin I saharoza. Rok valjanosti je za neotvorenu bočicu 4 godine, a za rekonstituiranu otopinu kemijska i fizikalna stabilnost lijeka u upotrebi je dokazana za 24 sata pri temperature od 2-8°C. S mikrobiološkog stajališta se lijek mora odmah primjeniti (HALMED, 2019).

Neotvorenu bočicu treba čuvati na temperaturi do 25°C.

#### 3.4.3.1. Terapijske indikacije i doziranje

Xeomin je indiciran za simptomatsko liječenje blefarospazma, prevladavajućeg rotacijskog oblika cervikalne distonije (spazmodični tortikolis) i spasticiteta gornjeg uda u odraslih (HALMED, 2019).

### Blefarospazam

Početna preporučena doza je 1,25 do 2,5 jedinica po mjestu injiciranja. Početna doza ne smije premašiti 25 jedinica po oku. Ukupno doziranje ne smije premašiti 100 jedinica svakih 12 tjedana. Periodi između ciklusa liječenja moraju se odrediti prema stvarnoj kliničkoj potrebi pojedinog bolesnika.

### Spazmazodični tortikolis

Ne smije se injicirati više od 200 jedinica u prvom ciklusu liječenja, s podešavanjem kod narednih ciklusa, ovisno o odgovoru. Ukupna doza od 300 jedinica ne smije se prekoračiti po bilo kojem ciklusu liječenja. Ne smije se dati više od 50 jedinica po bilo kojem mjestu injiciranja.

### Spasticitet gornjeg uda

Maksimalna ukupna doza za liječenje spasticiteta gornjeg uda ne smije prijeći 500 jedinica po ciklusu liječenja i ne smije se primijeniti više od 250 jedinica u mišiće ramena.

**Tablica 10.** Doziranje ovisno o zahvaćenom mišiću

|                                | <b>Jedinice (raspon)</b> | <b>Broj mjesta injiciranja po mišiću</b> |
|--------------------------------|--------------------------|--|
| <b>Flektirani ručni zglob</b>  |                          |  |
| Flexor carpi radialis          | 25-100                   | 1-2                                      |
| Flexor carpi ulnaris           | 20-100                   | 1-2                                      |
| <b>Zgrčena šaka</b>            |                          |  |
| Flexor digitorum superficialis | 25-100                   | 2  |
| Flexor digitorum profundus     | 25-100                   | 2  |
| <b>Flektirani lakat</b>        |                          |  |
| <i>Brachioradialis</i>         | 25-100                   | 1-3                                      |
| <i>Biceps</i>                  | 50-200                   | 1-4                                      |
| Brachialis                     | 25-100                   | 1-2                                      |
| <b>Pronirana podlaktica</b>    |                          |  |
| Pronator quadratus             | 10-50                    | 1  |
| Pronator teres                 | 25-75                    | 1-2                                      |
| <b>Palac u dlanu</b>           |                          |  |

|                                |        |     |
|--------------------------------|--------|-----|
| Flexor pollicis longus         | 10-50  | 1   |
| Adductor pollicis              | 5-30   | 1   |
| <i>Flexor pollicis brevis/</i> | 5-30   | 1   |
| <i>Opponens pollicis</i>       |        |     |
| <i>Subscapularis</i>           | 15-100 | 1-4 |
| <i>Teres major</i>             | 20-100 | 1-2 |

### 3.4.3.2. Nuspojave (vrlo česte i česte)

Obično su nuspojave (Tablica 11) zapažene unutar prvog tjedna nakon liječenja i privremene su prirode. Nuspojave mogu biti povezane s djelatnom tvari, s postupkom injiciranja, ili oboje (HALMED, 2019).

#### Nuspojave neovisne o indikaciji

##### *Nuspojave povezane s primjenom*

Lokalizirana bol, upala, parestezija, hipoestezija, osjetljivost, oticanje, edem, eritem, svrbež, lokalizirana infekcija, hematoma, krvarenje i/ili nastanak modrice mogu biti povezani s injiciranjem.

Bol i/ili anksioznost povezani s primjenom igle mogu rezultirati vazovagalnim odgovorima uključujući prolaznu simptomatsku hipotenziju, mučninu, tinitus i sinkopu.

##### *Nuspojave povezane s djelatnom tvari, botulinskim toksinom tipa A*

Lokalizirana slabost mišića je očekivani farmakološki učinak botulinskog toksina tipa A.

Vrlo rijetko su prijavljene nuspojave vezane uz širenje toksina udaljeno od mjesta primjene koje uzrokuju simptome koji su u skladu s učincima botulinskog toksina tipa A (pretjerana mišićna slabost, disfagija, aspiracijski pneumonitis s fatalnim ishodom u nekim slučajevima).

### Reakcije preosjetljivosti

Rijetko su prijavljene ozbiljne i/ili trenutne reakcije preosjetljivosti, uključujući anafilaksiju, serumsku bolest, urtikariju, edem mekog tkiva i dispneju. Neke od ovih reakcija prijavljene su nakon primjene konvencionalnog kompleksa botulinskog toksina tipa A samog ili u kombinaciji s drugim tvarima koje uzrokuju slične reakcije.

**Tablica 11.** Nuspojave (vrlo česte i česte)

| Nuspojave   | Učestalost        |
|---|-------------------|
| <b>Blefarospazam</b>  |                   |
| Glavobolja, facijalna pareza  | <i>Često</i>      |
| Ptoza kapaka, suhe oči  | <i>Vrlo često</i> |
| Zamućenje vida, oštećenje vida, diplopija, pojačano suženje                       | <i>Često</i>      |
| Suha usta, disfagija  | <i>Često</i>      |
| Bol na mjestu injiciranja, umor   | <i>Često</i>      |
| Mišićna slabost   | <i>Često</i>      |
| <b>Spamazmodični tortikolis</b>   |                   |
| Glavobolja, presinkopa, omaglica  | <i>Često</i>      |
| Disfagija   | <i>Vrlo često</i> |
| Suha usta, mučnina  | <i>Često</i>      |
| Pojačano znojenje   | <i>Često</i>      |
| Bol u vratu, mišićna slabost, mijalgija, spazam mišića, mišićno-koštana ukočenost | <i>Često</i>      |
| Bol na mjestu injiciranja, astenija   | <i>Često</i>      |

|                                  |              |
|----------------------------------|--------------|
| Infekcija gornjeg dišnog sustava | <i>Često</i> |
| <b>Spasticitet gornjeg uda</b>   |              |
| Suha usta                        | <i>Često</i> |

### **3.4.4. Posebna upozorenja i mjere opreza pri uporabi za sva tri pripravka: Botox<sup>®</sup>, Dysport<sup>®</sup> i Xeomin<sup>®</sup>**

Prije aplikacije bilo kojeg od tri pripravka liječnik mora poznavati anatomiju bolesnika i sve promjene anatomije vezano uz prethodne operativne zahvate. Kod liječenja je potrebno primijeniti mjere predostrožnosti kako bi se spriječilo injiciranje BoNT-A u krvnu žilu te se treba pažljivo injicirati kada su mjesta injiciranja blizu osjetljivih struktura kao što su karotidna arterija, apeksi pluća i jednjak.

BoNT-A se mora koristiti s oprezom ako se pojave poremećaji krvarenja bilo kojeg tipa u bolesnika koji primaju antikoagulantnu terapiju ili uzimaju druge tvari koje mogu imati antikoagulantni učinak.

Preporučene doze i učestalost primjene BoNT-a ne smiju se prekoračiti zbog mogućeg rizika od predoziranja, pretjerane mišićne slabosti, udaljenog širenja toksina i stvaranja neutralizirajućih antitijela kod Botox-a i Dysport-a. Početna doza u prvom liječenju bolesnika mora biti najmanja preporučena doza za tu indikaciju. Prepisivači i bolesnici moraju biti svjesni da nuspojave mogu nastupiti unatoč tome što su prethodna injiciranja bila dobro podnošena, stoga pojačan oprez mora biti prisutan pri svakom davanju lijeka.

Bolesnici s neuromuskularnim poremećajima mogu imati povećani rizik od pretjerane mišićne slabosti. U ovih bolesnika proizvod botulinskog toksina mora se koristiti samo pod nadzorom liječnika specijaliste i samo ako se smatra da korist liječenja premašuje rizik.

Bolesnike s poviješću disfagije i aspiracije treba liječiti s krajnjim oprezom.

Bolesnici liječeni terapijskim dozama mogu također osjetiti izrazitu mišićnu slabost.

Stariji i oslabljeni bolesnici moraju se liječiti s oprezom te prilikom izbora doze za starijeg bolesnika treba biti oprezan pa se preporučuje započeti najnižom dozom. Bolesnike ili njegovatelje treba savjetovati da potraže hitnu medicinsku pomoć ako se pojave poremećaji gutanja, govora ili disanja (HALMED, 2019; CBZ, 2019).

BoNT-A se mora koristiti s oprezom:

- u bolesnika koji pate od amiotrofične lateralne skleroze
- u bolesnika s drugim poremećajima koji rezultiraju perifernom neuromuskularnom disfunkcijom
- kod ciljanih mišića koji pokazuju izraženu slabost ili atrofiju.

Prijavljene su reakcije preosjetljivosti povezane s botulinskim neurotoksinom. Kao i kod svake injekcije moguće su ozljede povezane s postupkom primjene. Ukoliko se pojavi ozbiljna (npr. anafilaktička reakcija) i/ili trenutna reakcija preosjetljivosti nužno je primijeniti odgovarajuću medicinsku terapiju. Nakon injekcije na mjestu primjene može doći do lokalne infekcije, boli, upale, parestezije, hipoestezija, osjetljivosti, oticanja, eritema i/ili krvarenja / stvaranja modrica (HALMED, 2019; CBZ, 2019).

### **3.5. Nove formulacije**

S obzirom da svi pripravci na tržištu sadrže BoNT-A u obliku liofilizata, uz dodatak stabilizatora humanog serumskog albumina, pri čemu postoji mogućnost kontaminacije patogenima, razvijaju se tekuće formulacije sa stabilizatorima koji nisu animalnog porijekla. Dostupnoću tekuće formulacije izbjegla bi se potreba za rekonstitucijom te moguće pogreške pri razrjeđivanju i aplikaciji.

Bol i iritacija, a moguće i krvarenje na mjestu primjene, posebice ako se uzme u obzir preporučeni veći broj mjesta injiciranja, neugodni su neželjeni učinci invazivne primjene

BoNT-A. Stoga je cilj farmaceutke industrije razvijati nove formulacije i načine primjene koji bi bili manje invazivni ili neinvazivni. Trenutno se razvijaju oblici s BoNT-A za **transdermalnu** (pr. primjena BoNT-A uz pomoć iontoforeze za bolje prodiranje kroz kožu u terapiji hiperhidroze); **transurotelnu** (pr. liposomalna enkapsulacija BoNT-A kod pretjerano aktivnog mjehura; instilacija BoNT-A u mjehur uz prethodnu primjenu dimetil sulfoksida ili protamin sulfata koji omogućuju prodiranje toksina u mišićni zid mokraćnog mjehura) i **transepitelnu** (razvoj gela s BoNT-A za intranazalnu primjenu u terapiji alergijskog rinitisa) primjenu (Fonfria i sur., 2018).

#### 4. RASPRAVA

*C. botulinum* je karakterizirana jedinstvenim svojstvom proizvodnje botulinum neurotoksina. Temeljem rezultata brojnih istraživanja, danas govorimo o 4 fenotipske grupe i genotipska soja *C. botulinum* i o 7 različitih antigenih tipova toksina (A-G) (Carter i Peck, 2015; Monheit i Picket, 2017). Neki od neurotoksina su izuzetno potentni i mogu uzrokovati trovanja s fatalnim ishodom i u životinja i u ljudi (procjenjuje se da je letalna doza za čovjeka nakon parenteralne primjene 0,1–1 ng/kg). Botulizam uzrokuju neurotoksini iz različitih grupa *C. botulinum*, a karakteriziran je simetričnom padajućom paralizom mišića (Baron., 1996). Postoji nekoliko oblika botulizma povezanih s putem unosa toksina u organizam (probavni, anaerobno putem rane, respiratornim putem, intramuskularnom injekcijom prekomjernih doza), ali, u bilo kojem slučaju, glavna patološka karakteristika je generalizirana periferna neuroparaliza različitog opsega koja uključuje i skeletni i autonomni živčani sustav (Johnson i Montecucco, 2008). Jedan od najtoksičnijih od svih neurotoksina je BoNT-A koji se stvara kao kompleks od 900 kDa, a čini ga neurotoksična - biološki aktivna (toksična) komponenta veličine 150 kDa i netoksični proteini (Rosetto i sur., 2014; Pirazzini i sur., 2017). Premda nisu odgovorni za biološke učinke, netoksični proteini kao što su hemaglutinin (HA) i ne-hemaglutinini (NTNH) različitih veličina (od 300 kDa do 900 kDa) štite neurotoksičnu komponentu od degradacije u nepovoljnim uvjetima, primjerice kod kiselog pH, te stoga imaju bitnu ulogu uslijed trovanja (Carter i sur., 2015). Neurotoksični dio BoNT proteina je sintetiziran kao polipeptidni lanac od ~150 kDa koji se sastoji od lakog lanca (L lanac; koji ima 50 kDa) i teškog lanca (H lanac; 100 kDa). L i H lanac se drže zajedno dugačkim peptidnim pojasom i jednom disulfidnom vezom prikazano (Rosetto i sur., 2014). Oa lanca imaju precizno definiranu ulogu u procesu intoksikacije; dok su pod-domene H lanca odgovorne za vezanje toksina na dva vezna mjesta na membrani motoneurna te endocitozu i transcitozu (C-terminalni kraj H lanca odgovoran za presinaptičko vezanje i endocitozu, a N-



terminalni kraj H lanca je zaslužan za translokaciju L lanca preko membrane endosomskih vezikula u neuronalni citosol), L lanac je metaloproteazna domena koja specifično cijepa SNARE (eng., *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) proteine koji su neophodni za egzocitozu neurotransmitora. Pritom tipovi BoNT-B, -D, -F i -G cijepaju VAMP (engl. *vesicle-associated membrane protein*, poznat kao sinaptobrevin), BoNT-A, -C i -E cijepaju SNAP-25 (engl. *Synaptosomal-associated protein* veličine 25 kDa), dok BoNT-C dodatno cijepa i sintaksin (Rosetto i sur.,2014.)

Osim učinka na kolinergične neurone koji je najbolje opisan, pokusi na staničnim kulturama i izoliranim organima pokazali su da BoNT-A može inhibirati egzocitozu i drugih neurotransmitora, poput serotonina, noradrenalina, dopamina, glutamata, GABA-e, glicina, supstancije P, ATP-a i CGRP-a (Drinovac Vlah, 2017). Ti nalazi, najprije dobiveni u in vitro uvjetima, a zatim pokazani i na animalnim modelima i ispitivanjima na ljudima, potvrdili su mogućnost ulaska toksina i u druge neurone, primjerice senzorne te inhibiciju neuroegzocitoze različitihi neurotransmitora. Danas se mehanizmi djelovanja BoNT-A na različite vrste boli ne mogu objasniti bez da se ne pretpostavi ulazak BoNT-A u periferne završetke senzornih neurona, nakon čega slijedi retrogradni aksonalni transport do središnjih okončina i inhibicija lučenja neurotransmitora uključenih u nocicepciju (Matak i Lacković, 2014).

Ukoliko govorimo o primjeni toksina u nanogramsima u terapijske svrhe, tada je sistemsku farmakokinetiku nemoguće ispitati (premala količina toksina, nedovoljno osjetljive metode). O sudbini toksina nakon ulaska u periferne živčane okončine malo je podataka, odnosno nije jasno na koji se način i nakon koliko vremena biološki aktivni dio toksina eliminira iz neurona. Temeljem iskustva s primjenom u kliničkoj praksi, posebice zbog dugotrajnog djelovanja jednokratno primijenjenog BoNT-A, možemo pretpostaviti da izbjegava proteosomalnu degradaciju te da aktivna proteaza ostaje dugo vremena stabilna u

citosolu. Primjenom BoNT-A u terapijske svrhe također se primijetila distribucija izvan mjesta injiciranja (u okolne mišiće), što izaziva lokalizirane nuspojave kao što su neželjena paraliza susjednih mišića. Međutim, odgovarajući volumen, doza i metoda injektiranja mogu smanjiti incidenciju nuspojava induciranih raspršenjem toksina (Matak, 2015).

Tri su formulacije BoNT-A dostupne na tržištu u republici Hrvatskoj:

- Onabotulinum toxin A (ONA; Botox<sup>®</sup>; Allergan Inc., Dublin, Ireland)
- Abobotulinum toxin A (ABO; Dysport<sup>®</sup>; Ipsen, Paris, France)
- Incobotulinum toxin A (INCO; Xeomin<sup>®</sup>; Merz Pharmaceuticals GmbH, Frankfurt, Germany) (<http://almp.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/>).

Navedeni pripravci BoNT-A razlikuju se po ukupnom sastavu - količini neurotoksina i pomoćnih tvari (ekscipijensi); ukupnom proteinskom opterećenju; načinu dobivanja i rekonstitucije; stabilnosti pripravka; pH rekonstituiranog oblika; kliničkoj aktivnosti (ekvipotentnost); skladištenju; dostupnosti; odobrenim indikacijama; antigenosti. S obzirom na te razlike, svaki od ovih pripravaka pokazuje jedinstvene karakteristike te posljedično tome nisu međusobno zamjenjivi (Samizadeh i De Boule, 2017).

Za sigurnu kliničku primjenu i postizanje optimalnih rezultata kod određenih indikacija, liječnik treba razumjeti klinička pitanja poput potentnosti, stupanj konverzije i sigurnosti (širenje toksina i imunogenost). Učinak BoNT ovisi o mjestu primjene, koncentraciji i volumenu koji pak ovise o lokaciji, dubini i veličini mišića (drugog tkiva) u koji se injicira. Mnogobrojne studije uspoređuju karakteristike ovih triju produkata. Međusobno se razlikuju i u broju odobrenih indikacija, pri čemu Botox<sup>®</sup>, kao pripravak koji je najduže na tržištu ima i najveći broj indikacija te se široko koristi i izvan toga, u *off-label* terapiji različitih stanja. (Drinovac Vlah, 2017).

## 5. ZAKLJUČAK

- Clostridium botulinum je gram pozitivna anaerobna sporogena bakterija s jedinstvenim svojstvom proizvodnje botulinum neurotoksina (BoNT), od kojih je danas opisano 7 serotipova (A-G).
- Biološki aktivni dio molekule BoNT tipa A čini polipeptidni lanac od ~150 kDa koji se sastoji od lakog lanca (L lanac; 50 kDa) i teškog lanca (H lanac; 100 kDa). Dvije poddomene H lanca omogućavaju specifično vezanje za živčane završetke te endocitozu neurotoksina, dok je L lanac proteaza koja specifično cijepa SNAP-25, jedan od proteina ključih za proces lučenja neurotransmitora iz živčanih okončina.
- Visoka selektivnost za kolinergične neurone dovodi do inhibicije lučenja acetilkolina i mišićne paralize te disfunkcije autonomnih sinapsi, simptoma karakterističnih za botulizam.
- Temelj farmakološkog djelovanja BoNT-A je inhibicija lučenja neurotransmitora iz perifernih kolinergičnih, ali i senzornih okončina. Nanogramske količine BoNT-A injicirane izravno u mišić ili u dermis terapijski se koriste kod različitih stanja karakteriziranih hiperkontraktilnošću mišića te autonomnih poremećaja, ali i kod boli.
- BoNT-A je potentan i neurospecifičan, ima ograničen stupanj difuzije nakon lokalne primjene te je njegovo djelovanje reverzibilno.
- Do sada su na tržištu Europske unije dostupna tri registrirana pripravka BoNT-A (Botox®, Dysport® i Xeomin®) koji se međusobno bitno razlikuju u nekoliko karakteristika (ukupnom sadržaju proteina, količini i veličini toksina, stabilnosti, potentnosti, kao i indikacijskom području), zbog čega nisu međusobno zamjenjivi.
- Usprkos određenim nedostacima u razumijevanju mehanizma djelovanja i sudbine toksina u organizmu i neuronima, pripravci s BoNT-A se široko koriste u različitim indikacijama, a primjenu karakterizira dugo djelovanje nakon jednokratne primjene te

dobra podnošljivost. Primjena BoNT-A do sada je odobrena kod 11 indikacija, dok se off-label primjenjuje u više od 20 indikacija.

## 6. REFERENCE

1. Albrecht P, Jansen A, Lee JI, Moll M, Ringelstein M, Rosenthal D i sur. High prevalence of neutralizing antibodies after long-term botulinum neurotoxin therapy. *Neurology* 2019;92(1):48-54.
2. Aoki KR, Guyer B. Botulinum toxin type A and other botulinum toxin serotypes: A comparative review of biochemical and pharmacological actions. *Eur J Neurol* 2001;8:21–29.
3. Bach-Rojecky L, Relja M, Filipović B, Lacković Z. Botulinum toksin tipa A i kolinergički sustav. *Liječ vjesn* 2007;129:407-414.
4. Barash JR, Arnon SS. A novel strain of *Clostridium botulinum* that produces type B and type H botulinum toxins. *J Infect Dis* 2013;209(2):183–91.
5. Baron S. *Medical Microbiology*, 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
6. Benoit RM. Botulinum Neurotoxin Diversity from a Gene-Centered View. *Toxins* 2018;10:310.
7. Brin MF, James C, Maltman J. Botulinum toxin type A products are not interchangeable: a review of the evidence. *Biologics*. 2014;8:227-241
8. Carter AT, Peck MW. Genomes, neurotoxins and biology of *Clostridium botulinum* Group I and Group II. *Res Microbiol* 2015;166(4):303-317.
9. Dressler D, Tacik P, Saberi FA. Botulinum toxin therapy of cervical dystonia: comparing onabotulinumtoxin (Botox®) and incobotulinumtoxinA (Xeomin®). *J Neural Transm* 2014; 121(1):29-31.
10. Drinovac Vlah V. Središnji neurotransmitori i mehanizam antinociceptivnog djelovanja botulinum toksina tipa A. [Disertacija]. Zagreb:Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet; 2017.
11. Fonfria E, Maignel J, Lezmi S, Martin V, Splevins A, Shubber S i sur. The Expanding Therapeutic Utility of Botulinum Neurotoxins. *Toxins (Basel)* 2018;10(5):208
12. Frevert J. Content of Botulinum Neurotoxin in Botox®/Vistabel®, Dysport®/Azzalure®, and Xeomin®/Bocouture®. *Drug R D*. 2010;10(2):67-73
13. Frevert J. Pharmaceutical, Biological and Clinical Properties of Botulinum Neurotoxin Type A Products. *Drugs R D* 2015;15:1-9.
14. Frevert J. Xeomin is free from complexing proteins. *Toxicon* 2009;54(5):697-701.
15. Grein S, Mander G.J, Fink K. Stability of botulinum neurotoxin type A, devoid of complexing proteins. *Botulinum J* 2011;2(1):49-57.

16. Hacket G, Moore K, Burgin D, Hornby F, Gray B, Elliott M i sur. Purification and Characterization of Recombinant Botulinum Neurotoxin Serotype FA, Also Known as Serotype H. *Toxins* 2018; 10(5). pii: E195.
17. Hambleton P. Clostridium botulinum toxins: a general review of involvement in disease, structure, mode of action and preparation for clinical use. *J Neurol* 1992;239(1):16–20.
18. Harper CB, Martina S, Nyguen TH, Daniels SJ, Lavidis NA, Popoff MR i sur. Dynamin Inhibition Blocks Botulinum Neurotoxin Type A Endocytosis in Neurons and Delays Botulism. *J Biol Chem* 2011;286(41):35966-35976
19. Hefter H, Hartmann C, Kahlen U, Moll M, Bigalke H. Prospective analysis of neutralising antibody titres in secondary nonresponders under continuous treatment with a botulinumtoxin type A preparation free of complexing proteins—a single cohort 4-year follow-up study. *BMJ Open*. 2012;2(4). pii: e000646.
20. ISAPS International Survey on Aesthetic/Cosmetic Procedures performed in 2017:International Society of Aesthetic Plastic Surgery Dostupno na: [https://www.isaps.org/wpcontent/uploads/2018/10/ISAPS\\_2017\\_International\\_Study\\_Cosmetic\\_Procedures.pdf](https://www.isaps.org/wpcontent/uploads/2018/10/ISAPS_2017_International_Study_Cosmetic_Procedures.pdf); Pristupljeno Ožujak 2019.
21. Johnson EA. Validity of botulinum neurotoxin serotype H. *J Infect Dis* 2014;210:992–993.
22. Johnson E.A, Monteucco C. Botulism. *Handb Clin Neurol* 2008;91:333-368.
23. Jost WH, Benecke R, Hauschke D, Jankovic J, Kanovsky P, Roggenkämper P, Simpson DM, Comella CL. Clinical and pharmacological properties of incobotulinumtoxin A and its use in neurological disorders. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:1913-1926.
24. Kalb SR, Baudys J, Smith TJ, Smith LA, Barr JR. Characterization of Hamagglutinin Negative Botulinum Progenitor Toxins. *Toxins* 2017; 9(6). pii: E193.
25. Kane CD, Nuss JE, Bavari S. Novel therapeutic uses and formulations of botulinum neurotoxins: a patent review (2012-2014). *Expert Opin Ther Patents* 2015;25(6):675-690.
26. Kollw K et al. Long-term treatment of chronic migraine with OnabotulinumtoxinA: efficacy, quality of life and tolerability in a real-life setting. *J Neural Transm* 2016; 123(5):533-40
27. Kukreja, R.; Chang, T.-W.; Cai, S.; Lindo, P.; Riding, S.; Zhou, Y.; Ravichandran, E.; Singh, B.R. Immunological characterization of the subunits of type A botulinum neurotoxin and different components of its associated proteins. *Toxicon* 2009;53:616–624.
28. Matak I. Central antinociceptive activity of botulinum toxin A [Disertacija]. Zagreb:Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2015.
29. Matak I, Lacković Z. Botulinum toxin A, brain and pain. *Prog Neurobiol* 2014;119-120:39-59.

30. Monheit GD, Pickett A. AbobotulinumtoxinA: A 25-Year History. *Aesthet Surg J* 2017; 37(1):4-11.
31. Nakamura K, Kohda T, Shibata Y, Tsukamoto K, Arimitsu K, Hayashi M i sur. Unique Biological Activity of Botulinum D/C Mosaic Neurotoxin in Murine Species. *Infect Immun* 2012;80(8):2886-2893.
32. Pickett A. Botulinum toxin as a clinical product: manufacture and pharmacology. In: Foster K. (ur) *Clinical Applications of Botulinum Neurotoxin. Current Topics in Neurotoxicity*, vol 5. Springer, New York, 2014; str. 7-49.
33. Pirazzini M, Rosetto O, Eleopra R, Montecucco C. Botulinum neurotoxins: Biology, Pharmacology and Toxicology. *Pharmacol Rev* 2017;69:200-235.
34. Roggenkämper P, Jost WH, Bihari K, Comes K, Grafe S, NT 201 Blepharospasm Study team. Efficacy and safety of a new Botulinum Toxin Type A free of complexing protein in the treatment of blepharospasm. *J Neural Transm* 2006;113(3):303-12.
35. Ropoff M.R, Polain B. Bacterial Toxins and the Nervous System: Neurotoxins and Multipotential Interacting with Neuronal Cells. *Toxins* 2010;2:683-737.
36. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 6th edition. (ur. Rowe RC, Sheskey PJ i Quin ME); Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association; London, 2009.
37. Rosetto O, Pirazzini M, Montecucco C. Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol* 2014;12:535-549.
38. Samizadeh S, De Boule K. Botulinum neurotoxin formulations: overcoming the confusion. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2018;11:273-287.
39. Sažetak opisa svojstava lijeka Botox.  
Dostupno na: <http://www.almp.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-14-02-06.pdf> Pristupljeno travanj 2019.
40. Sažetak opisa svojstava lijeka Dysport.  
Dostupno na:  
[http://www.cbz.si/zzs/pao/bazazdr2.nsf/o/42090297C1C2A346C12579C2003F50FE/\\$File/s-021607.pdf](http://www.cbz.si/zzs/pao/bazazdr2.nsf/o/42090297C1C2A346C12579C2003F50FE/$File/s-021607.pdf) Pristupljeno travanj 2019.
41. Sažetak opisa svojstava lijeka Xeomin.  
Dostupno na: [http://halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/SPC\\_UP-I-530-09-14-02-326-327-i-SPC\\_UP-I-530-09-14-01-265-12955.pdf](http://halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/SPC_UP-I-530-09-14-02-326-327-i-SPC_UP-I-530-09-14-01-265-12955.pdf)) Pristupljeno travanj 2019.
42. Smith TJ, Hill KK, Raphael BH. Historical and current perspectives on Clostridium botulinum diversity. *Res Microbiol* 2015;166(4):290-302.
43. Scaglione F, Conversion Ratio between Botox<sup>®</sup>, Dysport<sup>®</sup>, and Xeomin<sup>®</sup> in Clinical Practice. *Toxins* 2016;8(3):65.

44. Tehran D.A, Pirazzini M. Novel Botulinum –neurotoxins: Exploring Underneath the Iceberg Tip. *Toxins (Basel)* 2019;10(5):190.
45. Walker T.J, Dayan S.H. Comparison and Overview of Currently Available Neurotoxins. *J Clin Aesthet Dermatol* 2014;7(2):31-39.
46. Wang L, Sun Y, Yang W, Lindo P, Singh B.R. Type A botulinum neurotoxin complex proteins differentially modulate host response of neuronal cells. *Toxicon* 2014;82:52-60.
47. Yiannakopoulou E. Serious and Long-Term Adverse Events Associated with the Therapeutic and Cosmetic Use of Botulinum Toxin. *Pharmacology* 2015;95:65–69.



