



# Botulinski nevrotoksin: odkritje in uporaba v dermatologiji

Botulinum neurotoxin: its history and use in dermatology

Eva Rauh,<sup>1</sup> Larisa Stojanovič<sup>2</sup>

## Izvleček

Botulinski nevrotoksin je izredno strupena beljakovina, ki jo tvori anaerobna po Gramu pozitivna bakterija *Clostridium botulinum*. Zgodba o odkritju botulinskega nevrotoksina se je pričela s pojavljanjem nepojasnjenih zastrupitev s klobasami, iz česar tudi izvira njegovo ime. Latinska beseda za klobaso je namreč *botulus*. Zgodba o tem se je nadaljevala s stoletji raziskav in še poteka z njegovo vedno širšo uporabo v medicini. Botulinski nevrotoksin v aktivni obliki postane proteolitični encim, izključno specifičen za fuzijske beljakovine kompleksa SNARE v presinaptičnih živčnih končičih. Prek kemodenervacije začasno zavre delovanje tarčnega tkiva, na skeletnih in gladkih mišicah povzroči npr. začasno ohlapno paralizo mišic. Botulinski nevrotoksin se uporablja v nevrologiji, za zdravljenje čezmerne aktivnosti sečnega mehurja in tudi v dermatologiji, kjer njegovo uporabo še vedno mnogi povezujejo zgolj z estetikom. Novejša dognanja pa razkrivajo, da botulinski nevrotoksin zmanjšuje bolečino in srbež ter vpliva tudi na nekatere nenevronske celice, kot npr. epidermalne keratinocite, dermalne fibroblaste, vnetne celice, lojnice, žilne endotelne celice in mezenhimske matične celice v podkožnem maščevju. Odkritja napovedujejo tudi možno razširitev nabora indikacij v dermatologiji. Članek predstavi zgodovino razvoja botulinskega nevrotoksina, njegovo sestavo, mehanizem delovanja in trenutne ter obetavne indikacije za uporabo v dermatologiji.

## Abstract

Botulinum neurotoxin is a highly toxic protein produced by the anaerobic Gram-positive bacterium *Clostridium botulinum*. The discovery of botulinum neurotoxin began with unexplained sausage poisonings, hence its name. The Latin word for sausage is *botulus*. The knowledge of neurotoxin has grown through centuries of research, and clinical trials are still underway to support new indications with the increasingly widespread use of this toxin in medicine. Botulinum neurotoxin is a protein molecule that, in its active form, becomes a proteolytic enzyme exclusively specific for SNARE complex fusion proteins in presynaptic nerve endings. In the process of chemodenervation, it temporarily inhibits the action of the target tissue, causing, for example, temporary flaccid muscle paralysis on skeletal and smooth muscle. Botulinum neurotoxin is used in neurology to treat bladder overactivity and in dermatology, where botulinum neurotoxin is still widely associated

<sup>1</sup> Kirurški center Avelana, Otočec, Slovenija

<sup>2</sup> Inštitut za anatomijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

**Korespondenca / Correspondence:** Eva Rauh, e: [eva@rauh.si](mailto:eva@rauh.si)

**Ključne besede:** *Clostridium botulinum*; botulizem; dermatologija; estetska medicina; zgodovina medicine

**Key words:** *Clostridium botulinum*; botulism; dermatology; aesthetic medicine; history of medicine

**Prispelo / Received:** 13. 3. 2021 | **Sprejeto / Accepted:** 4. 8. 2021

**Citirajte kot/Cite as:** Rauh E, Stojanovič L. Botulinski nevrotoksin: odkritje in uporaba v dermatologiji. Zdrav Vestn. 2022;91(9–10):430–40.

**DOI:** <https://doi.org/10.6016/ZdravVestn.3241>



Avtorske pravice (c) 2022 Zdravniški Vestnik. To delo je licencirano pod Creative Commons Priznanje avtorstva-Nekomercialno 4.0 mednarodno licenco.

with aesthetics alone. Recent findings reveal that botulinum neurotoxin reduces pain and itching and also affects some non-neuronal cells, such as epidermal keratinocytes, dermal fibroblasts, inflammatory cells, sebaceous cells, vascular endothelial cells, and mesenchymal stem cells in subcutaneous fat. The findings are promising for expanding the range of indications in dermatology too. The following article presents the history of botulinum neurotoxin development, its structure, mechanism of action, as along with current and promising indications for use in dermatology.

## 1 Uvod

Botulinski nevrotoksin (BoNT) je za človeka ena najbolj strupenih naravnih učinkovin. Ob predpostavki, da znaša povprečna teža zemljana 70 kg, bi zgolj 39,2 g te snovi lahko izkoreninilo skoraj celotno človeško raso (5,6 milijarde zemljanov) (1). Kljub temu, da gre za enega najsmrtonosnejših poznanih strupov nasploh, pa je v majhnih odmerkih uspešno sredstvo za zdravljenje številnih zdravstvenih težav (2). Botulinski nevrotoksin deluje tako, da v presinaptičnih živčnih končičih kot proteolitični encim začasno zavre sproščanje neurotransmitorja in s tem zavre delovanje tarčnega tkiva (3).

Poleg vse pogostejše uporabe v nevrologiji, na primer za zdravljenje strabizma, vratne distonije, različnih vrst spazmov in kroničnih migrenskih glavobolov, se nabor indikacij za njegovo uporabo širi tudi na druga področja. Veliko obeta njegova zmožnost lajšati bolečino (4).

V dermatologiji ga mnogi še vedno povezujejo zgolj z uporabo za estetske namene, vendar novejša dognanja dokazujejo prav nasprotno. Priljubljenost v dermatologiji najpogosteje uporabljenega botulinškega nevrotoksina serotipa A (BoNT-A) je med letoma 1997 in 2016 narasla za nepredstavljenih 6.956,6 % (5). Raziškovalci in zdravniki tudi na tem področju odkrivajo vedno širše indikacije za uporabo BoNT, ki presegajo zgolj estetske namene. Spodbudni rezultati so na voljo za uporabo BoNT pri zdravljenju številnih dermatoloških bolezni, vendar so za širšo uporabo v klinični praksi še potrebne nadaljnje raziskave (6).

## 2 Zgodovina

Zgodba o odkritju beljakovine, ki jo danes poznamo pod imenom BoNT, je dolga in pestra. Človeštvo se je prek nepojasnjenih zastrupitev s to snovjo srečevalo že od nekdaj. Že ob pregledu indijske zgodovine zasledimo, da so maharadže uporabljali »strup«, pridobljen iz klobas, za ubijanje sovražnikov. Z razvojem civilizacije so se pojavljali različni poskusi konzerviranja hrane. Tisti manj uspešni so predstavljali ugodno okolje za rast mikroorganizmov in pogosto povzročali različne

zastrupitve (7). Razvoj BoNT do oblike, kot jo poznamo in v medicini uporabljamo danes, je terjal več kot sto let trajajoča klinična opažanja in laboratorijske poskuse (8).

### 2.1 Množične zastrupitve

Prva ohranjena pisna poročila o nepojasnjenih zastrupitvah izvirajo iz časov Napoleonovih vojn (1803–1815). Zaradi ekonomske krize je zelo upadel higienski standard pripravljanja in shranjevanja hrane (9). Takrat (leta 1793) je v vasici Wildbad na jugozahodu današnje Nemčije izbruhnila množična zastrupitev nepojasnjene vzroka. Kmalu so ugotovili, da ne gre za osamljen primer tovrstne zastrupitve. Pri vseh zastrupljenih so opazovali podobne simptome, med drugim tudi midriazo, zato so sprva za zastrupitev krivili volčjo češnjo (*lat.* Atropa belladonna) (10). Množične zastrupitve s hrano, tudi s smrtnim izidom (stopnja smrtnosti 5–50 %), je v Stuttgartu opisoval vojvoda Friderik I., ki je takrat vladal na Wurtemberškem. Kmalu so zastrupitve povezali z uživanjem neustrezno shranjene hrane, zlasti različnih klobas. Neznani trup so zato poimenovali »strup klobas«. Leta 1802 je oblast v Stuttgartu izdala javno opozorilo o nevarnosti uživanja dimljenih klobas (11). Glavna tema razprav so postala ugibanja o sestavi snovi, ki je povzročala zastrupitve (8). Omenjenih je bilo več kemičnih snovi, za najverjetnejši vzrok pa so sumili cianovodikovo kislino. Za nasvet so vprašali tudi strokovnjake Medicinske fakultete v Tübingenu, ki so prvi pričeli omenjati, da je najverjetnejši vzrok zastrupitev organski. Profesor Autenrieth je takrat predlagal sistematično zbiranje vseh poročil o zastrupitvah. Na njihovi podlagi je prvi zbral in objavil simptome, ki jih danes poznamo pod izrazom botulizem (11).

Za naslednji večji premik pri odkrivanju toksina je bil zaslužen Justinus Kerner, nemški zdravnik in pesnik, ki je natančno preučeval dotlej opisane izbruhe zastrupitev. Objavil je dve monografiji, in sicer leta 1820 in 1822. V prvi se je posvečal zlasti zbiranju primerov in natančnim kliničnim opisom simptomov zastrupitev s klobasami (bruhanje, trebušni krči, midriaza,

ptoza, disfagija, dihalna odpoved). Njegovo zanimanje za vzrok zastrupitev pa je spodbujalo naraščajočo željo po osamitvi te neznane strupene snovi. Pričel je s posmrtnimi raziskavami žrtev in s poskusi na različnih živalih, ki jim je apliciral izvleček, pridobljen iz pokvarjenih klobas (11). Poskuse je delal tudi na sebi, pri čemer je opazil suhost ustne sluznice že po nanosu nekaj kapljic te snovi na jezik (10). V svoji drugi monografiji je objavil rezultate svojih raziskav in hipotezo o izvoru strupa (11). Domneval je, da je za zastrupitev odgovorna snov, ki se nahaja v maščobnem delu hrane in uspeva v anaerobnem okolju (9). Verjel je, da ima ta »maščobni strup«, kot ga je sam poimenoval, biološki izvor. Predpostavljal je, da potuje po živčnem sistemu in moti prevajanje signala v živčnih poteh. Okvaro, ki jo povzroča, je primerjal z zarjavelimi električnimi žicami (8). V delu je bila prvič postavljena domneva, da bi neznan strup lahko uporabili tudi za medicinske namene, na primer za zdravljenje pretirane vzdražnosti živčnega sistema, neželenih mišičnih gibov in zmanjšanje pretiranega izločanja znoja in sluzi (9). Skoraj neverjetno se zdi, da se približno 200 let po njegovih napovedih BoNT uporablja tudi za te indikacije (8).

## 2.2 Odkritje bakterije in nevrotoksina

Belgijski profesor mikrobiologije Emile van Ermenegem je prvi odkril bakterijo, odgovorno za opisane zastrupitve s hrano. Poročilo o tem je objavil leta 1897 (12). Dokazal je namreč, da posmrtna tkiva skupine zastrupljenec v neki belgijski vasi in pokvarjena šunka, ki so jo vsi jedli, vsebujejo veliko število enakih paličastih po Gramu pozitivnih bakterij. Poimenoval jih je *Bacillus botulinus*. Ime izhaja iz latinske besede za klobaso, *botulus* (10,11). V začetku 20. stoletja so mikrobiologi pričeli ugotavljati, da ne obstaja zgolj ena vrsta te bakterije, pač pa gre za heterogeno skupino. Takrat so bakterijo priključili rodu anaerobnih bakterij klostridij (*lat. Clostridium*). Preimenovali so jo v *Clostridium botulinum* (*C. botulinum*) (8).

Botulinski nevrotoksin je leta 1928 prvič v surovi obliki stabilnega kislinskega precipitata izoliral dr. Herman Sommer v Kaliforniji (9). Precipitat je bil osnova za nadaljnje raziskave tega strupa. Zanimanje za podrobnejše raziskovanje in proizvodnjo večjih količin strupa je narastlo v času druge svetovne vojne (11). V ameriškem mikrobiološkem laboratoriju v vojaški bazi Fort Detrick so strup intenzivno preučevali ter razvili tehniko koncentriranja in kristalizacije (8). Poskusi uporabiti BoNT kot biološko orožje v tem času kljub prizadevanjem niso bili uspešni (7). Leta 1946 je dr. Schantz s kolegi v Fort

Detricku razvil tehniko priprave očiščenega BoNT, kar je utrla pot njegovi proizvodnji v večjih količinah in kasneje uporabi v medicini. Namenjen je bil za državne zaloge in raziskovalne inštitute v ZDA. Leta 1969 so ZDA oznanile uničenje vseh svojih zalog biološkega orožja. Tri leta kasneje so v več kot 100 državah podpisali Konvencijo o biološkem in toksičnem orožju. Takrat so zaprli tudi vojaški mikrobiološki laboratorij v Fort Detricku (11). Doktor Schantz je nadaljeval svoje raziskave na Univerzi v Wisconsinu. Leta 1979 je pripravil veliko serijo BoNT-A, primerno za klinično uporabo. Ta izvirna serija je bila v medicini v uporabi vse do leta 1997 kot edina serija BoNT, ki jo je za uporabo odobrila ameriška Uprava za hrano in zdravila (*angl. Food and Drug Administration, FDA*) (9).

## 2.3 Pričetki uporabe botulinskega nevrotoksina v medicini

Prvi večji rezultati na področju odkrivanja mehanizma delovanja BoNT na človeško tkivo segajo v leto 1949. Takrat je Burgen s sodelavci poročal, da BoNT-A, vbrizgan v hiperaktivno mišico, onemogoči sproščanje nevrotoksinorja acetilholina (ACh) iz živčnih končičev živčno-mišičnega stika ali motorične ploščice in na ta način mišico začasno ohromi (7). Znani so bili tudi poskusi na piščančjih zarodkih, v katere so vbrizgali BoNT. S temi poskusi so dokazali, da vbrizgavanje BoNT povzroči od odmerka odvisno mišično atrofijo in oslabitev (8). Odkritja so vzbudila veliko zanimanja za terapevtsko uporabo BoNT v medicini. Ameriški oftalmolog Scott je v sodelovanju z dr. Schantzem, ki mu je dobavljal BoNT, prvi pričel leta 1973 vbrizgavati te snovi opicam za zdravljenje strabizma (13). Rezultati so bili obetavni in leta 1980 je objavil prvo poročilo tudi o posegih na človeških prostovoljcih. Posege je odobrila FDA (14). Scott je objavljaval izsledke svojih raziskav, v katerih je dokazoval učinkovitost BoNT na zmanjšanje ali celo preprečitev neželenih gibov obraznih mišic, kot sta na primer blefarospazem in hemifacialni spazem (8). Po njegovih prizadevanjih je FDA leta 1989 odobrila uporabo BoNT-A (takrat znanega pod tržnim imenom *Oculinum*, dve leti kasneje preimenovanega v *Botox*) za zdravljenje strabizma, blefarospazma in hemifacialnega spazma. S tem se je odprla pot odkrivanju tudi ostalih indikacij za uporabo BoNT (11).

Dogajanje v naslednjih desetletjih je ena najizjemnejših zgodb o razvoju biološke snovi za uporabo v medicini. Številne večje multicentrične raziskave so vodile v nova spoznanja o BoNT in odpirale pot njegovi uporabi tudi za druge medicinske indikacije. Močan in

strah zbujačo bakterijski strup se je razvil v učinkovito zdravilno učinkovino za zdravljenje in lajšanje preko medicinskih simptomov. Sčasoma in z odkrivanjem različnih seroloških tipov toksina so se razvili še drugi izdelki BoNT različnih proizvajalcev pod različnimi tržnimi imeni (8).

Odkritje estetskih učinkov BoNT je bilo naključno, saj so bolniki ob zdravljenju spazma in neželenih gibov obraznih mišic zdravnikom pričeli poročati tudi o ugodnem stranskem učinku – glajenju obraznih gub. Prvo formalno poročilo o možnih estetskih učinkih BoNT sta objavila v Kaliforniji Clark in Berris leta 1989. Bolnici s parezo levega obraznega živca (*lat.* nervus facialis, VII. možganski živec), ki jo je motila obrazna asimetrija, sta vbrizgala BoNT na neprizadeto stran obraza. Poročala sta o ugodnih učinkih BoNT na glajenje gub in zmanjšanje obrazne mimike, kar je zmanjšalo tudi asimetrijo obraza (15).

Leta 2000 je FDA odobrila uporabo BoNT za zdravljenje vratne distonije (11). Za odobritev uporabe na področju dermatologije je bilo potrebno počakati še nekaj let. Leta 2002 je FDA odobrila uporabo BoNT za glajenje glabelarnih gub (navpičnih gub med obrvmi), leta 2004 pa tudi za zdravljenje aksilarne hiperhidroze (čezmernega znojenja v predelu pazduh). Kasneje so sledile odobritve še za nekatere druge medicinske indikacije, kot na primer za čezmerno dejavnost sečnega mehurja, migrenske glavobole in spastičnost mišic ob različnih nevroloških boleznih (8). Leta 2013 je FDA odobrila njegovo uporabo za glajenje gub okrog očesa, štiri leta kasneje pa še za glajenje gub na čelu. Še vedno pa je v dermatologiji veliko tudi nenamenske uporabe (*angl.* off-label use) (7). Nenehno potekajoče študije raziskujejo morebitne nove možnosti za uporabo BoNT. Veliko je tudi raziskav o možnostih zdravljenja bolečine. Tudi v dermatologiji obstajajo obeti za razširitev nabora indikacij uporabe, kar opisuje tudi v nadaljevanju članka (10).

### 3 Botulinski nevrotoksin

#### 3.1 Izvor in zgradba

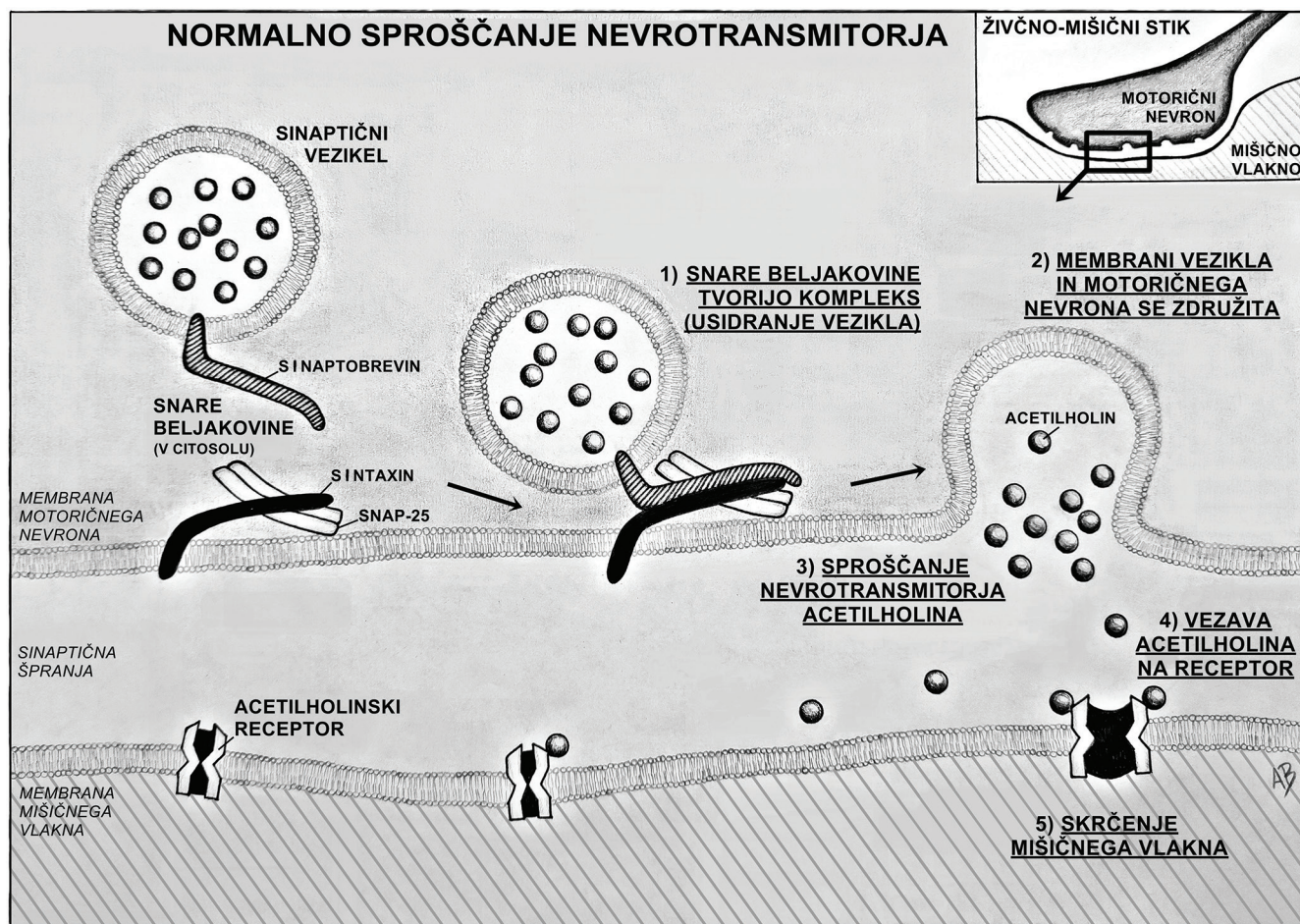
Botulinski nevrotoksin tvori anaerobna po Gramu pozitivna bakterija *C. botulinum*. Bakterija se nahaja na rastlinah, v zemlji, vodi in tudi prebavilih živali (16). Tvori zelo odporne endospore in najmočnejši naravni strup, kar ji omogoča preživetje v najrazličnejših okoljih. Leta raziskovanj so privedla do odkritja, da obstaja več različnih sevov te bakterije. Na podlagi fizioloških, presnovnih in genskih lastnosti so jih razvrstili v 6 skupin. Vsaka od njih tvori vsaj 1 od 7 poznanih seroloških tipov

BoNT, nekatere pa celo več (17,18).

**Botulinski nevrotoksin** sestavlja polipeptidna veriga molekulske mase 150 kDa in je v tej obliki manj aktiven. Polipeptidno verigo sestavljata težka (100 kDa) in lahka (50 kDa) veriga, ki sta povezani z disulfidnim mostičkom (18). Težka veriga ima dve funkcionalni enoti. Prva je domena, ki z izjemno selektivnim mehanizmom omogoči vezavo na tarčni receptor. Ima visoko afiniteto za specifične membranske gangliozidne receptorje in beljakovino SV2 na presinaptični membrani motoričnih nevronov. Druga je translokacijska domena (19,20,21). Glavne naloge težke verige so interakcija BoNT s tarčno celico, njegov vstop v celico ter prenos lahke verige na mesto delovanja. Lahka veriga pa je od cinka odvisen proteolitični encim in s tem aktivni del BoNT (22). Aktivna oblika BoNT nastane torej šele po razgradnji te polipeptidne verige (18). Bakterija ne tvori BoNT v takšni »čisti« obliki, temveč ga še poveže z nekaterimi drugimi beljakovinami. To so tako nehemaglutininske kot tudi hemaglutininske beljakovine (23). Skupaj tvorijo makromolekulski beljakovinski kompleks molekulske mase do 900 kDa. Te pomožne beljakovine niso strupene, temveč stabilizirajo kompleks in zaščitijo BoNT pred vplivi okolja (spremembe pH, temperaturne spremembe, delovanje encimov). Nekatere omogočajo tudi adhezijo na tarčne celice (npr. na celice v prebavilih) (24).

Različne vrste BoNT so ločili s serološkimi metodami. Danes je znanih 7 antigensko različnih serotipov BoNT, ki so razvrščeni v še več kot 40 podtipov (25). Serotipi so poimenovani po abecedi od A do G (BoNT-A do BoNT-G). Med seboj so si strukturno podobni, razlikujejo pa se serološko in antigensko (11). Najmočnejši med njimi je serotip BoNT-A, sledita mu serotipa BoNT-B in BoNT-F. Serotipi A, B in E so najpogosteje povezani z botulizmom pri človeku (16). Od leta 2013 se omenja še 8. serotip, imenovan BoNT-H (25). Pot do klinične uporabe sta si zaenkrat utrla serotipa A in B, pri čemer je za uporabo v dermatologiji odobren zgolj serotip A (16). Na trgu so na voljo trije glavni izdelki serotipa BoNT-A, pridobljeni iz bakterije *C. botulinum* seva Hall. Znani so pod generičnimi imeni abobotulinum toksin A (tržno ime *Dysport*, *Azzalure*), incobotulinum toksin A (tržno ime *Xeomin*, *Bocouture*) in onabotulinum toksin A (tržno ime *Botox*, *Vistabel*). Onabotulinum toksin A je bil prvi tržno dostopen po odobritvi FDA za uporabo v dermatologiji. Originalno serijo je proizvedel Schantz leta 1979 in je bila v uporabi do leta 1997. Abobotulinum toksin A in onabotulinum toksin A vsebujeta toksin, povezan v makromolekulski beljakovinski kompleks. Posebnost incobotulinum toksina A pa je v tem, da vsebuje čisti 150 kDa težek BoNT-A brez beljakovinskega





**Slika 1:** Normalno sproščanje neurotransmiterja v živčno-mišičnem stiku (motorični ploščici).

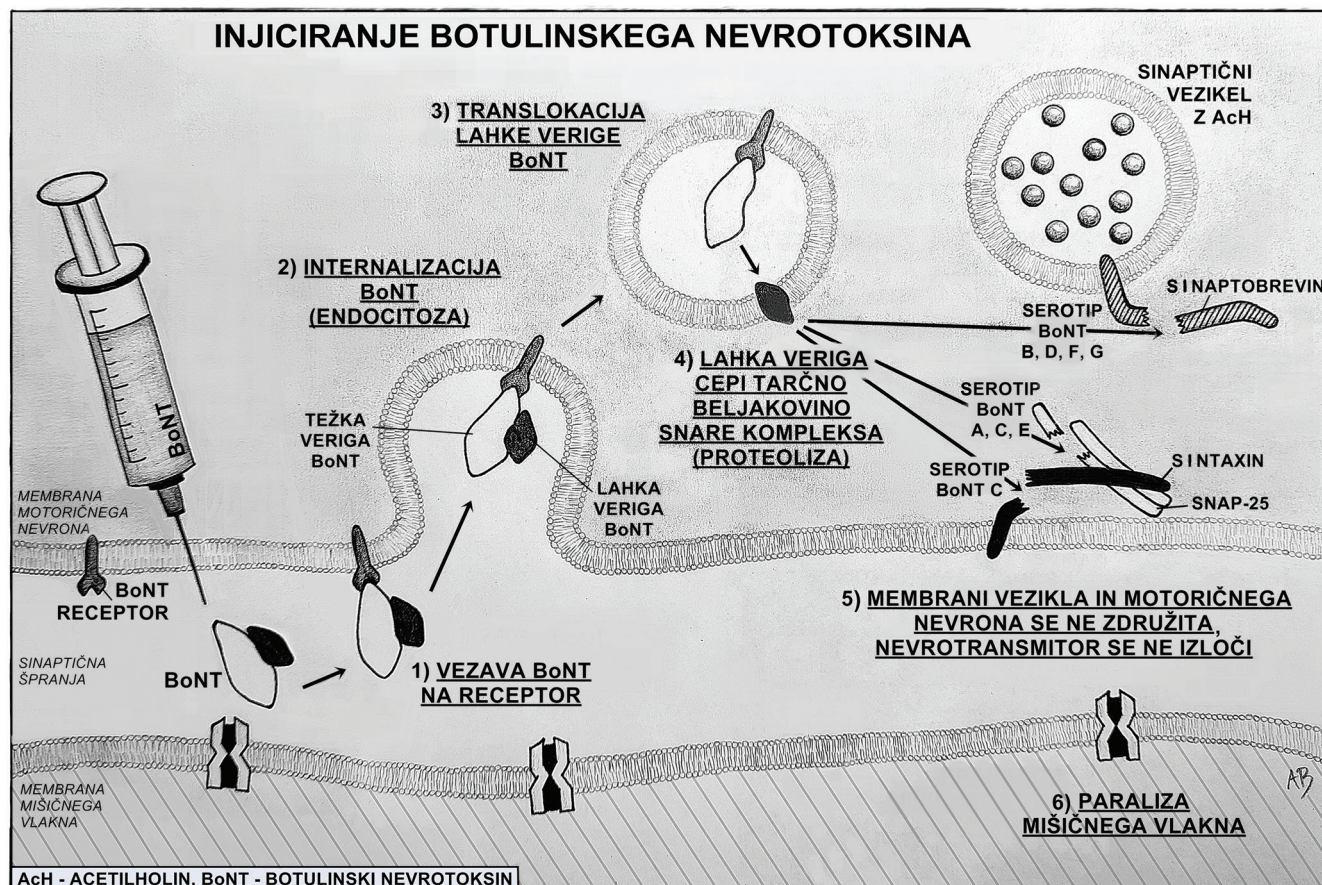
kompleksa, kar naj bi zmanjšalo verjetnost za tvorbo nevtralizirajočih protiteles (22). Vsi trije izdelki so shranjeni s pomožno snovjo, ki dodatno stabilizira pripravek. To je humani albumin z dodatkom laktoze (abobotulinum toksin A), saharoze (incobotulinum toksin A) oz. natrijevega klorida (onabotulinum toksin A). Pripravki se shranjujejo in prodajajo v liofilizirani obliki in jih je zato potrebno pred uporabo raztopiti v 0,9-odstotni vodni raztopini natrijevega klorida v ustreznem razmerju. Enote pri odmerjanju BoNT so specifične za vsak izdelek in niso med seboj zamenljive. Na trgu je za uporabo v medicini dostopen tudi serotip BoNT-B, ki se prodaja pod tržnima imenoma *Myobloc* in *NeuroBloc*, vendar se ju zaenkrat ne uporablja za estetske namene (16).

### 3.2 Mehanizem delovanja

Botulinski nevrotoksin je cinkova metaloproteinaza, ki začasno prepreči sproščanje neurotransmiterja ACh iz perifernih holinergičnih živčnih končičev v sinaptično špranjo. S tem onemogoči prenos živčnega signala

do tarčnega tkiva, to so npr. skeletne in gladke mišice ter znojne žleze (24). Ob prenosu živčnega impulza se namreč iz presinaptičnih živčnih končičev v sinaptično špranjo sprosti vsebina sinaptičnih veziklov – neurotransmiter. To se zgodi v procesu od kalcija odvisne eksocitotične zlitje veziklov s presinaptično membrano živčnega vlakna (26). Zlitje omogočajo posebne fuzijske beljakovine, ki skupaj tvorijo kompleks SNARE (*angl.* soluble N-ethyl-maleimide-sensitive factor attachment protein receptor). Te so sinaptobrevin (*angl.* vesicle associated membrane protein, VAMP) na membrani sinaptičnega vezikla in na membrani presinaptičnega živčnega končiča sintaksin ter SNAP-25 (*angl.* synaptosomal associated-protein, 25 kDa) (27). Kompleks SNARE omogoča pritrditev sinaptičnega vezikla na presinaptično membrano in v primeru ustreznega živčnega impulza (depolarizacije) tudi njegovo zlitje z membrano ter sprostitve neurotransmiterja v sinaptično špranjo. Tam se ACh veže na svoj receptor na postsinaptični membrani tarčnega tkiva in izzove ustrezen odziv (npr. krčenje skeletne in gladke mišice, izločanje znoja) (Slika 1).





**Slika 2:** Delovanje botulinskega nevrotoksina v živčno-mišičnem stiku (motorični ploščici).

Delovanje BoNT lahko razdelimo na 4 zaporedne korake: vezava, internalizacija, translokacija in proteoliza tarčne beljakovine kompleksa SNARE znotraj presinaptičnega nevrona (Slika 2). Botulinski nevrotoksin se po vbrizganju nahaja sprva v sinaptični špranji. Od tam mora za svoje delovanje vstopiti v presinaptični nevron. Domena težke verige BoNT, ki je odgovorna za vezavo na tarčni receptor, se specifično veže na gangliozične receptorje holinergičnih presinaptičnih živčnih končičev. V procesu internalizacije z endocitozo vstopi v nevron. Nizek pH v endocitotskem veziklu povzroči določene strukturne spremembe BoNT, čemur sledi razpad disulfidne vezi med težko in lahko verigo. Lahka veriga prečka membrano endocitotskega vezikla in vstopi v citosol nevrona (24). Pri tej translokaciji lahke verige igra ključno vlogo translokacijska domena težke verige (22). Dokončno v citosol sproščena in zdaj katalitsko aktivna lahka veriga se v presinaptičnem nevronu visoko specifično veže na eno od 3 beljakovin kompleksa SNARE in onemogoči njegov nastanek. Na katero beljakovino kompleksa SNARE se bo lahka veriga toksina vezala, je odvisno od serološkega serotipa BoNT. Serotipi B, D, F

in G se vežejo na sinaptobrevin, serotip C na sintaksin in SNAP-25, serotip E in najpogosteje uporabljeni serotip A le na SNAP-25 (24). Vezava lahke verige BoNT na specifično beljakovino kompleksa SNARE temelji na izjemno natančni molekularni zgradbi, ki omogoča ujemanje toksina s prav to tarčno beljakovino. Vezava je zelo občutljiva na najmanjše strukturne spremembe. Lahka veriga BoNT-A na primer visoko specifično cepi zgolj peptidno vez Gln197-Arg198 na beljakovini SNAP-25 (28,29). Končni učinek – preprečitev zlitja sinaptičnega vezikla s presinaptično membrano v živčno-mišičnem stiku – je pri vseh serotipih BoNT enak. Najbolj raziskane tarče delovanja BoNT so skeletna in gladka mišična vlakna ter eksokrine žleze (24). Na mišična vlakna BoNT deluje tako, da povzroči t.i. kemodenervacijo in s tem ohlapno mišično paralizo (ohromelost). Zavre lahko do največ 80 % izvirnega delovanja mišice (3). Na eksokrine žleze BoNT deluje tako, da zavre izločanje njihovega izločka (sline, znoja) (24).

Botulinski nevrotoksin je stabilna molekula. Njen razpolovni čas je 60 dni. Vezava BoNT na beljakovine kompleksa SNARE in njihova razgradnja sta nepovratna

processa. Končni učinek, ki ga BoNT povzroči, pa je samo začasen. Povrnitev mišične moči in ostalih funkcij tarčnega tkiva je posledica neprekinjenega celičnega obnavljanja. Proces se prične nekaj tednov po vbrizganju BoNT in po povprečno 3–6 mesecih postopno doseže stanje pred vbrizganjem. Za povrnitev delovanja sta ključni proliferacija novih živčnih končičev in tvorba novih sinaptičnih stikov. K njej prispevata tudi nadomeščanje razgrajenih beljakovin kompleksa SNARE z novimi ter spodbujanje genov za sintezo receptorjev ACh. Ključno vlogo pri teh procesih ima signalizacija prek inzulina podobnega ravnega dejavnika 1 (IGF-1). Obstajajo dokazi, da ponavljajoče se vbrizgavanje BoNT vodi v počasnejšo povrnitev funkcije. Po nekaj mesecih učinki BoNT prenehajo s popolno obnovo delovanja tarčnega tkiva (30).

Novejše raziskave dokazujejo, da vseh učinkov BoNT ni mogoče pojasniti le z njegovim delovanjem na periferne živčne končiče. Kot kaže, je BoNT (podobno kot njemu sorodni tetanusni nevrotoksin) sposoben potovati po živčnih vlaknih. Tako neposredno učinkuje tudi na centralni živčni sistem. Poskusi potrjujejo, da po perifernem vbrizgavanju BoNT ta prek neposrednega učinka na sprednje in zadnje rogove hrbtenjače lahko vpliva tako na motoriko kot tudi na zaznavanje bolečine (31). Analgetični učinek BoNT so sprva povezovali zgolj z njegovim učinkom na mišično sproščanje. Vendar pa so številne raziskave dokazale, da analgetični učinek in mišična relaksacija ne sovpadata vedno. Obstajajo dokazi, da BoNT vpliva na aferentno prevajanje bolečinskega signala. Inhibira namreč sproščanje substance P, ki je vključena v zaznavanje bolečine, vazodilatacijo in nevrogeno vnetje. Nevrogeno vnetje nastane zaradi sproščanja vazoaktivnih neuropeptidov iz živčnih končičev perifernih senzoričnih nevronov, kot sta peptid, povezan z genom za kalcitonin (*angl.* calcitonin gene-related peptide, CGRP) in substanca P. Sprožita ga lahko poškodba tkiva ali bolečinski dražljaj. Botulinski nevrotoksin zavira tudi sproščanje nekaterih neurotransmitorjev, kot je na primer glutamat, iz česar lahko sklepamo, da je analgetični učinek BoNT povezan z inhibiranjem prenosa signala v senzoričnih nevronih. Ta spoznanja nadalje raziskujejo morebitno uporabo pri zdravljenju bolečinskih sindromov, postherpetične nevralgije in nove indikacije v nevrologiji (4,32).

Tudi v dermatologiji vztrajno poteka raziskovanje možne uporabe BoNT še za druge namene. Nedavne raziskave kažejo, da BoNT vpliva tudi na delovanje nekaterih drugih celic, ki izražajo adhezijske receptorje zanj in v sami celici vsebujejo beljakovino SNAP-25, ki je tarča najpogosteje uporabljene serotipa BoNT-A. To so npr.

epidermalni keratinociti, dermalni fibroblasti, vnetne celice, lojnice, žilne endotelne celice in mezenhimske matične celice v podkožnem maščevju, kar je obetavno za razširitev nabora indikacij tudi v dermatologiji. Tej tematiki se podrobneje posvečava v naslednjem poglavju (5,33).

### 3.3 Indikacije za uporabo v dermatologiji

Leta 2002 je FDA odobrila uporabo BoNT-A za glajenje glabelarnih gub. Odtlej se je njegova uporaba za estetske namene neznansko povečala, zato ga marsikdo še vedno povezuje zgolj z estetsko dermatologijo. Novejša dognanja pa kažejo, da ima BoNT-A mnogo širši nabor delovanja, kot se je predvidevalo sprva. Vpliva namreč na različne vrste celic, tudi v koži. Raziskave se zato zdaj usmerjajo v odkrivanje možnosti uporabe BoNT-A, ki presegajo estetske indikacije. V nadaljevanju predstavlja tako uveljavljene kot tudi na novo odkrite možne indikacije uporabe BoNT v dermatologiji, pri čemer imamo v mislih le uporabo serotipa A (16).

#### 3.3.1 Glajenje obraznih gub

Posebnost obraznih mimičnih mišic je, da imajo svoje pripenjalnice v koži. Z vsakim skrčenjem mišice se naguba tudi nad njo ležeča koža. Na ta način ustvarjamo obrazno mimiko. Pravokotno na smer krčenja mišice pa nastanejo obrazne gube. Te so sprva vidne le ob krčenju mišic (dinamične gube), z leti pa zaradi sočasnih strukturnih sprememb kože postajajo bolj ali manj stalne (statične gube) (34). Botulinski nevrotoksin prepreči sproščanje ACh na motorični ploščici in s tem ohromi mimične mišice na mestu vbrizganja. Uporablja se za glajenje čelnih in glabelarnih gub, odpravljanje finih gub okrog in pod očmi ter za dvig obrvnega loka. V okviru nenamenske uporabe se ga poslužujemo tudi za zaviranje povešanja ustnega koticčka (vbrizganje v m. depressor anguli oris), poudarjanje obrisa čeljustnice (vbrizganje v m. masseter) oz. na vratu (vbrizganje v m. platysma) in prsnem košu (16).

Mišična ohromelost nastopi običajno v obdobju do 48 ur po vbrizganju. Čas nastopa ohromelosti je odvisen od anatomije, mesta vbrizganja in individualnih (genetskih) razlik mišic. Učinek je tudi večji, če se BoNT-A vbrizga v sredino mišičnega vlakna, kjer se nahaja večja koncentracija motoričnih ploščic (nevromodulacija). Najpomembnejše je natančno poznavanje anatomije, saj so mišična vlakna različnih mimičnih mišic organizirana drugače. Za potrditev najustrežnejšega mesta za vbrizganje si nekateri pomagajo tudi z elektromiogramom (30).



### 3.3.2 Hiperhidroza

Hiperhidroza je stanje, za katerega je značilno čezmerno izločanje ekzernih žlez znojnic, ki se nahajajo predvsem na dlaneh, podplatih in v pazduhah (5). Posledica je čezmerno znojenje, ki presega termoregulacijske potrebe telesa (2). Primarna hiperhidroza, ki torej ne nastane kot posledica nekega drugega bolezenskega stanja ali jemanja določenih zdravil, prizadene okrog 3 % populacije. Za prizadete posameznike je veliko psihično breme. Dokazano je, da BoNT-A zmanjša ali zavre izločanje znoja na mestu vbrizganja in tako bistveno izboljša kakovost življenja. Zato je zdravljenje primarne hiperhidroze z BoNT-A eno najbolj razširjenih indikacij (5). Poslužujemo se ga zlasti po nezadostnem uspehu topikalnega zdravljenja (2). Botulinski nevrotoksin serotipa A se vbrizga v kožo s ciljem zavreti prenos živčnega signala na holinergičnih živčnih končičih, ki oživčujejo žleze znojnice. S tem se začasno zavre izločanje znoja. Uporabo BoNT-A je FDA odobrila za zdravljenje aksilarne hiperhidroze, pri kateri so uspehi zdravljenja dobri. Podatki o zdravljenju hiperhidroze dlani in podplatov so bolj skromni. Pri vbrizganju v predelu dlani je potrebna posebna previdnost na področju mišic palčeve kepe (tenarja), saj obstaja tveganje, da se nehote ohromijo mišice. Opisano je bilo zdravljenje tudi drugih telesnih predelov zaradi čezmernega znojenja, prav tako pa tudi zdravljenje osmidroze (5). Pri zdravljenju hiperhidroze je težaven tudi pojav nadomestnega znojenja drugih, prej neprizadetih telesnih predelov (2).

### 3.3.3 Možne indikacije

Poleg že uveljavljenih indikacij za uporabo BoNT-A v dermatologiji veliko obetajo novejša ugotovitve. Kaže, da bi bil BoNT-A primeren tudi za zdravljenje nekaterih drugih dermatoloških bolezni. Botulinski nevrotoksin serotipa A so že poskušali uporabljati za zdravljenje *hipertrofičnih brazgotin in keloidov*, saj zmanjša mišično kontrakcijo v območju brazgotine. Na ta način se zmanjšajo pritisk na robove rane, mikropoškodbe in vnetje tega predela. Botulinski nevrotoksin serotipa A naj bi zaviral izražanje transformirajočega rastnega dejavnika beta (TGF-beta), ki je glavni posrednik pri oblikovanju hipertrofične brazgotine (5). V nekaterih raziskavah ugotavljajo, da je lokalno vbrizganje BoNT-A v primerjavi z vbrizgavanjem kortikosteroidnih pripravkov enako učinkovito. Dodatni prednosti BoNT-A sta tudi zmanjšana srbež in bolečina na mestu brazgotine (35). Vsekakor pa so potrebne še nadaljnje raziskave o dejanski vlogi BoNT-A v procesu brazgotinjenja, saj si zaenkrat izsledki raziskav še zelo nasprotujejo.

Botulinski nevrotoksin serotipa A se je izkazal kot

uspešna snov tudi pri zdravljenju *mastne kože*, ki je pogosta dermatološka nevšečnost (36). Pretirano izločanje loja maši ustja dlačno-lojnih mešičkov. Razrast bakterij na tem mestu povzroči vnetja, kot so akne in seboroični dermatitis. Mehanizem delovanja vbrizganja BoNT-A v kožo na zmanjšanje tvorbe loja še ni v celoti pojasnjen. Predvideva se, da so tarča delovanja lokalni receptorji ACh v žlezah lojnicah. Potrebne so nadaljnje raziskave za določitev ustrezne količine in tehnike vbrizganja (6).

Številnim bolezenskim stanjem v dermatologiji se pridružuje intenzivni *srbež*. Antipruritičen učinek BoNT-A v manjših pilotnih raziskavah veliko obeta. Mehanizem delovanja še ni povsem razjasnjen, pomemben pa naj bi bil zlasti vpliv BoNT-A na zaviranje sproščanja neurotransmitorjev substance P, glutamata, ACh, CGRP in ostalih mediatorjev, ki so lahko vključeni v sicer kompleksno patogenezo srbeža (37). Acetilholin je pomemben posrednik v procesu nastanka srbeža pri številnih dermatoloških boleznih, npr. pri *atopijskem dermatitisu*. Tudi substanca P povzroča sproščanje histamina prek aktiviranja mastocitov. Je močan vazodilatator, tako kot je CGRP. Botulinski nevrotoksin serotipa A tudi neposredno vpliva na zaviranje degranulacije mastocitov. Srbež je običajno povezan z vnetjem kože. Glede na to, da BoNT-A zmanjšuje nevrogeno vnetje, je z umiritvijo srbeža pričakovati tudi izboljšanje stanja primarne kožne spremembe (6). To potrjujejo tudi raziskave pri bolnikih z *luskavico* in atopijskim dermatitisom, kot so na primer izsledki o izboljšanju stanja luskavice po naključni poškodbi periferne živčnega sistema (38). Lokalno vbrizganje BoNT-A pri inverzni luskavici ugodno učinkuje tudi zaradi zmanjšanja znojenja in s tem manj pogostega vnetja kože v kožnih pregibih (6). Podoben naj bi bil tudi mehanizem delovanja BoNT-A pri bolnikih s *Hailey-Hailey boleznijo (družinski benigni pemfigus)*. Gre za redko genetsko kožno bolezen z izbruhi mehurjev in razjed, zlasti v kožnih gubah, ki lahko srbijo (39). Botulinski nevrotoksin serotipa A prek zmanjšanja znojenja, maceracije tkiva in srbeža izboljša stanje sprememb (37).

Zanimivo je tudi odkritje, da BoNT-A ugodno vpliva na zdravljenje *rozacee*, ki je kronično vnetno stanje kože kompleksne etiopatogeneze, povezano tudi z delovanjem mastocitov. Botulinski nevrotoksin serotipa A tudi tu zmanjšuje nevrogeno vnetno komponento, saj zavira sproščanje neuropeptida substance P, ki sicer v procesu nevrogenega vnetja aktivira mastocite. Poleg tega BoNT-A cepi tudi beljakovine kompleksa SNARE v mastocitih, ki sodelujejo pri njihovem aktiviranju. Z njihovo razgradnjo BoNT-A neposredno zavira degranulacijo mastocitov. Ti učinki BoNT-A vodijo v protivnetno dogajanje. Botulinski nevrotoksin serotipa A bi zaradi svojega večtarčnega



delovanja lahko nudil prednost pred trenutno uveljavljenimi zdravili za zdravljenje rozacee (40).

Botulinski nevrotoksin serotipa A se je izkazal kot učinkovito sredstvo za odpravljanje *bolečin* ob nekaterih drugih kožnih spremembah, kot so na primer boleči kožni *leiomiomi* in periorbitalni *siringomi* (5). Tudi pri multiplih ekzematih *hidrocistomih* je lokalno vbrizganje BoNT-A varno in učinkovito zdravljenje (41).

### 3.4 Neželeni učinki

Botulinski nevrotoksin je za človeka ena najbolj poznanih strupenih učinkovin. Toksičnost se pogosto izraža v enotah (*angl.* unit, U). Ena enota (1 U) BoNT ustreza srednjemu smrtnemu odmerku (srednji letalni dozi, LD50) za 20 g težko švicarsko miš. Občutljivost na BoNT pa se razlikuje med posameznimi živalskimi vrstami. Srednji smrtni odmerek za opice znaša 39 U/kg. Glede na te ugotovitve so ocenili, da znaša pri vbrizganju pripravka kristalnega BoNT LD50 za 70 kg težkega človeka v mišico ali žilo okvirno 40 U/kg telesne teže. Uporabljen enkratni odmerek je v dermatologiji bistveno nižji od tega odmerka. Pri zdravljenju večjih površin (npr. plantarna hiperhidroza) se vbrizgana količina onabotulinum toksina A giblje do 250 U na zdravljeni predel. Pri vbrizganju za estetske namene so uporabljeni odmerki še manjši (5,34,42).

Glede na klinične izkušnje, retrospektivne raziskave in metaanalize je zdravljenje z BoNT varno za širok spekter terapevtskih in estetskih indikacij. *Lokalni* stranski učinki nastanejo zaradi premočnega učinkovanja toksina in difuzije v okolna tkiva. Na obrazu so začasni neželeni učinki na primer asimetrija obraza, ptoza obrvi, zgornje veke ali ustnice in ektropij zaradi šibkosti mimičnih mišic, strabizem ter motnje mimike obraza. Ob vbrizganju BoNT v okolico platizme so možni tudi disfagija, suha usta in občutek šibkosti vratu. Incidenco stranskih učinkov je možno zmanjšati ob upoštevanju smernic za uporabo BoNT, pravilni izbiri bolnika za določen poseg in z ustreznim odmerkom in tehniko vbrizgavanja. Možni stranski učinki so tudi krvavitev, rdečina in bolečina na mestu vbrizganja. Lahko se pojavijo tudi glavoboli, ki izzvenijo najkasneje v 4 tednih (34,43).

V odobrenih indikacijah uporabe BoNT v dermatologiji se uporabljajo tako majhne količine toksina, da poročil o oddaljenem širjenju učinkov BoNT pri katerem koli odobrenem izdelku BoNT pri zdravih odraslih ni. Raziskave potrjujejo, da priporočeni odmerki ne privedejo do *sistemskih* učinkov in BoNT po vbrizganju ni merljiv v periferni krvi. Prevelik odmerek BoNT bi lahko povzročil sistemske znake, kot so slabša mišična moč, zamegljen vid, ptoza in redko življenje ogrožajoče stanje s simptomi,

ki jih poznamo pod imenom botulizem. Poročil o dolgoročnih stranskih učinkih pri odobreni uporabi BoNT v dermatologiji ni.

Kot vsaka telesu tuja beljakovina lahko tudi BoNT izzove imunski odziv. To je bolj verjetno pri pogostih ponavljajočih se vbrizganjih BoNT. Poleg 150 kDa težkega nevrotoksina se v nekaterih tržno dostopnih izdelkih nahaja BoNT vezan v kompleksu z drugimi beljakovinami, kar še poveča tveganje za tvorbo nevtralizirajočih protiteles. Zato je mogoče, da nadaljnja vbrizganja BoNT niso uspešna. Na imunogenost vpliva tudi uporabljeni odmerek. Rezultati se zelo razlikujejo med bolniki in med posameznimi raziskavami. Še vedno ni določena pogostost in odmerek, ki pogojujeta imunski odziv. Ugotavlja se tudi, da se pri nekaterih bolnikih kljub tvorbi protiteles učinek delovanja BoNT pri prihodnjih zdravljenjih nujno ne zmanjša. V dermatologiji, zlasti za estetske namene, so uporabljene količine BoNT majhne in kljub občasno pogostejšim ponovitvam vbrizganja ni velike nevarnosti za neuspeh prihodnjih zdravljenj (44). Večja ameriška raziskava iz leta 2009, ki je analizirala tvorbo protiteles pri vnosu BoNT za glajenje glabelarnih gub pri 1.554 posameznikih, je dokazala, da se pri nobenem od njih niso razvila nevtralizirajoča protitelesa. Tudi uspeh prihodnjih zdravljenj ni bil nič manjši (45). Zaključimo lahko, da odsotnost jasnih dokazov o tvorbi protiteles pri dermatološki uporabi BoNT nakazuje, da je njihov nastanek zelo malo verjeten (44).

## 4 Zaključek

Kljub temu, da se včasih zdi tematika uporabe BoNT že povsem preverjena, pa novejša dognanja izpodbijajo predsodke in korenito spreminjajo pogled stroke na uporabo BoNT. Sodi med zdravila z obetavnim širokim naborom indikacij za klinično uporabo, čeprav je trenutno še vedno veliko nenamenske uporabe. Botulinski nevrotoksin veliko obeta na mnogih področjih, na primer na področju nevrologije, lajšanja bolečine, srbeža in drugih. Vedno več je raziskav, ki odkrivajo nove možne indikacije zdravljenja tudi na področju dermatologije.

Že zdaj pa obstaja dovolj poročil, na podlagi katerih lahko zaključimo, da je povezava BoNT zgolj z estetiko že preteklost.

### Izjava o navzkrižju interesov

Avtorici nimava navzkrižja interesov.

### Zahvala

Zahvaljujemo se ilustratorici Anji Bolčina za pregledni ilustraciji.

## Literatura

- Dhaked RK, Singh MK, Singh P, Gupta P. Botulinum toxin: bioweapon & magic drug. *Indian J Med Res.* 2010;132(5):489-503. PMID: 21149997
- Nawrocki S, Cha J. Botulinum toxin: pharmacology and injectable administration for the treatment of primary hyperhidrosis. *J Am Acad Dermatol.* 2020;82(4):969-79. DOI: 10.1016/j.jaad.2019.11.042 PMID: 31811879
- Karsai S, Raulin C. Do different formulations of botulinum toxin type A really have different migration characteristics? *J Cosmet Dermatol.* 2008;7(3):230. DOI: 10.1111/j.1473-2165.2008.00395.x PMID: 18789061
- Kim YG, Bae JH, Kim H, Wang SJ, Kim ST. A Proposal for Botulinum Toxin Type A Injection Into the Temporal Region in Chronic Migraine Headache. *Toxins (Basel).* 2020;12(4):214. DOI: 10.3390/toxins12040214 PMID: 32231158
- Guida S, Farnetani F, Nisticò SP, Mariarosaria CG, Babino G, Pellacani G, et al. New trends in botulinum toxin use in dermatology. *Dermatol Pract Concept.* 2018;8(4):277-82. DOI: 10.5826/dpc.0804a05 PMID: 30479855
- Kim YS, Hong ES, Kim HS. Botulinum Toxin in the Field of Dermatology: novel Indications. *Toxins (Basel).* 2017;9(12):403. DOI: 10.3390/toxins9120403 PMID: 29258169
- França K, Kumar A, Fioranelli M, Lotti T, Tirant M, Rocca MG. The history of Botulinum toxin: from poison to beauty. *Wien Med Wochenschr.* 2017;167(8):46-8. DOI: 10.1007/s10354-017-0553-7 PMID: 28299552
- Jabbari B. A Neurotoxin Which is Used for Health – How it all Began? In: Jabbari B, ed. *Botulinum Toxin Treatment – What Everyone Should Know.* New York: Springer; 2018. pp. 1-8. DOI: 10.1007/978-3-319-99945-6\_1
- Ting PT, Freiman A. The story of *Clostridium botulinum*: from food poisoning to Botox. *Clin Med (Lond).* 2004;4(3):258-61. DOI: 10.7861/clinmedicine.4-3-258 PMID: 15244362
- Monheit GD, Pickett A, Abobotulinumtoxin A. AbobotulinumtoxinA: A 25-Year History. *Aesthet Surg J.* 2017;37:54-11. DOI: 10.1093/asj/sjw284 PMID: 28388718
- Meyler Z, Cooper G. History and Mechanism of Action. In: Cooper G, ed. *Therapeutic Uses of Botulinum Toxin.* New Jersey: Humana Press; 2007. pp. 1-5. DOI: 10.1007/978-1-59745-247-2\_1
- Van Ermengem E. Ueber einen neuen anaeroben Bacillus und seine Beziehungen zum Botulismus. *Med Microbiol Immunol (Berl).* 1897;26(1):1-56. DOI: 10.1007/BF02220526
- Scott AB, Rosenbaum A, Collins CC. Pharmacologic weakening of extraocular muscles. *Invest Ophthalmol.* 1973;12(12):924-7. PMID: 4203467
- Scott AB. Botulinum toxin injection into extraocular muscles as an alternative to strabismus surgery. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus.* 1980;17(1):21-5. DOI: 10.3928/0191-3913-19800101-06 PMID: 7365644
- Clark RP, Berris CE. Botulinum toxin: a treatment for facial asymmetry caused by facial nerve paralysis. *Plast Reconstr Surg.* 1989;84(2):353-5. DOI: 10.1097/00006534-198908000-00027 PMID: 2748749
- Nigam PK, Nigam A. Botulinum toxin. *Indian J Dermatol.* 2010;55(1):8-14. DOI: 10.4103/0019-5154.60343 PMID: 20418969
- Nantel AJ. *Clostridium botulinum: International Programme on Chemical Safety Poisons Information Monograph 858 Bacteria.* Genève: World Health Organization; 2002. pp. 5-10.
- Glass K, Marshall K. *Clostridium botulinum.* In: Morris JG, Potter ME, eds. *Foodborne Infections and Intoxications.* 4th ed. San Diego: Elsevier; 2013. pp. 373-8. DOI: 10.1016/B978-0-12-416041-5.00027-5
- Montana V, Liu W, Mohideen U, Parpura V. Single molecule measurements of mechanical interactions within ternary SNARE complexes and dynamics of their disassembly: SNAP25 vs. SNAP23. *J Physiol.* 2009;587(Pt 9):1943-60. DOI: 10.1113/jphysiol.2009.168575 PMID: 19273577
- Wenzel RG. Pharmacology of botulinum neurotoxin serotype A. *Am J Health Syst Pharm.* 2004;61(22):S5-10. DOI: 10.1093/ajhp/61.suppl\_6.S5 PMID: 15598004
- Poulain B, Popoff MR, Molgó J. How do the botulinum neurotoxins block neurotransmitter release: from botulism to the molecular mechanism of action. *Botulinum J.* 2008;1(1):14-87. DOI: 10.1504/TBJ.2008.018951
- Pirazzini M, Rossetto O, Eleopra R, Montecucco C. Botulinum Neurotoxins: Biology, Pharmacology, and Toxicology. *Pharmacol Rev.* 2017;69(2):200-35. DOI: 10.1124/pr.116.012658 PMID: 28356439
- Panjwani N, O'Keefe R, Pickett A. Biochemical, functional and potency characteristics of type A botulinum toxin in clinical use. *Botulinum J.* 2008;1(1):153-66. DOI: 10.1504/TBJ.2008.018956
- Rossetto O. Botulinum Toxins: Molecular Structures and Synaptic Physiology. In: Jabbari B, ed. *Botulinum Toxin Treatment in Clinical Medicine. A Disease-Oriented Approach.* New Haven: Springer International Publishing AG; 2018. pp. 1-9. DOI: 10.1007/978-3-319-56038-0\_1
- Peck MW, Smith TJ, Anniballi F, Austin JW, Bano L, Bradshaw M, et al. Historical Perspectives and Guidelines for Botulinum Neurotoxin Subtype Nomenclature. *Toxins (Basel).* 2017;9(1):38. DOI: 10.3390/toxins9010038 PMID: 28106761
- Koren S. Bakterijski toksini. In: Gubina M, Ihan A, eds. *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo.* Ljubljana: Medicinski razgledi; 2002. pp. 83-4.
- Dong M, Liu H, Tepp WH, Johnson EA, Janz R, Chapman ER. Glycosylated SV2A and SV2B mediate the entry of botulinum neurotoxin E into neurons. *Mol Biol Cell.* 2008;19(12):5226-37. DOI: 10.1091/mbc.e08-07-0765 PMID: 18815274
- Bonventre PF, Kempe LL. Physiology of toxin production by *Clostridium botulinum* types A and B. III. Effect of pH and temperature during incubation on growth, autolysis, and toxin production. *Appl Microbiol.* 1959;7(6):374-7. DOI: 10.1128/am.7.6.374-377.1959 PMID: 13802635
- Silvaggi NR, Wilson D, Tzipori S, Allen KN. Catalytic features of the botulinum neurotoxin A light chain revealed by high resolution structure of an inhibitory peptide complex. *Biochemistry.* 2008;47(21):5736-45. DOI: 10.1021/bi8001067 PMID: 18457419
- Nestor MS, Arnold D, Fischer DL. The mechanisms of action and use of botulinum neurotoxin type A in aesthetics: Key Clinical Postulates II. *J Cosmet Dermatol.* 2020;19(11):2785-804. DOI: 10.1111/jocd.13702 PMID: 32866999
- Mazzocchio R, Caleo M. More than at the neuromuscular synapse: actions of botulinum neurotoxin A in the central nervous system. *Neuroscientist.* 2015;21(1):44-61. DOI: 10.1177/1073858414524633 PMID: 24576870
- Ding XD, Zhong J, Liu YP, Chen HX. Botulinum as a Toxin for Treating Post-herpetic Neuralgia. *Iran J Public Health.* 2017;46(5):608-11. PMID: 28560190
- Grando SA, Zachary CB. The non-neuronal and nonmuscular effects of botulinum toxin: an opportunity for a deadly molecule to treat disease in the skin and beyond. *Br J Dermatol.* 2018;178(5):1011-9. DOI: 10.1111/bjd.16080 PMID: 29086923
- Satriyasa BK. Botulinum toxin (Botox) A for reducing the appearance of facial wrinkles: a literature review of clinical use and pharmacological aspect. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2019;12:223-8. DOI: 10.2147/CCID.S202919 PMID: 31114283
- Shaarawy E, Hegazy RA, Abdel Hay RM. Intralesional botulinum toxin type A equally effective and better tolerated than intralesional steroid in the treatment of keloids: a randomized controlled trial. *J Cosmet Dermatol.* 2015;14(2):161-6. DOI: 10.1111/jocd.12134 PMID: 25810045



36. González C, Franco M, Londoño A, Valenzuela F. Breaking paradigms in the treatment of psoriasis: use of botulinum toxin for the treatment of plaque psoriasis. *Dermatol Ther.* 2020;33(6):e14319. DOI: [10.1111/dth.14319](https://doi.org/10.1111/dth.14319) PMID: [32949180](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32949180/)
37. Gazerani P. Antipruritic Effects of Botulinum Neurotoxins. *Toxins (Basel).* 2018;10(4):143. DOI: [10.3390/toxins10040143](https://doi.org/10.3390/toxins10040143) PMID: [29596343](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29596343/)
38. Zhu TH, Nakamura M, Farahnik B, Abrouk M, Lee K, Singh R, et al. The Role of the Nervous System in the Pathophysiology of Psoriasis: A Review of Cases of Psoriasis Remission or Improvement Following Denervation Injury. *Am J Clin Dermatol.* 2016;17(3):257-63. DOI: [10.1007/s40257-016-0183-7](https://doi.org/10.1007/s40257-016-0183-7) PMID: [26935938](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26935938/)
39. López-Ferrer A, Alomar A. Botulinum toxin A for the treatment of familial benign pemphigus. *Actas Dermosifiliogr.* 2012;103(6):532-5. DOI: [10.1016/j.adengl.2012.07.003](https://doi.org/10.1016/j.adengl.2012.07.003) PMID: [21872830](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21872830/)
40. Choi JE, Werbel T, Wang Z, Wu CC, Yaksh TL, Di Nardo A. Botulinum toxin blocks mast cells and prevents rosacea like inflammation. *J Dermatol Sci.* 2019;93(1):58-64. DOI: [10.1016/j.jderm.2018.12.004](https://doi.org/10.1016/j.jderm.2018.12.004) PMID: [30658871](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30658871/)
41. Gheisari M, Hamedani B, Robati R, Mozafari N. Intralesional botulinum toxin-A injection for the treatment of multiple eccrine hidrocystomas. *J Cosmet Laser Ther.* 2018;20(5):287-92. DOI: [10.1080/14764172.2017.1406608](https://doi.org/10.1080/14764172.2017.1406608) PMID: [29384393](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29384393/)
42. Scott AB, Suzuki D. Systemic toxicity of botulinum toxin by intramuscular injection in the monkey. *Mov Disord.* 1988;3(4):333-5. DOI: [10.1002/mds.870030409](https://doi.org/10.1002/mds.870030409) PMID: [3211180](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3211180/)
43. Sundaram H, Signorini M, Liew S, Trindade de Almeida AR, Wu Y, Vieira Braz A, et al.; Global Aesthetics Consensus Group. Global Aesthetics Consensus: Botulinum Toxin Type A—Evidence-Based Review, Emerging Concepts, and Consensus Recommendations for Aesthetic Use, Including Updates on Complications. *Plast Reconstr Surg.* 2016;137(3):518e-29e. DOI: [10.1097/01.prs.0000475758.63709.23](https://doi.org/10.1097/01.prs.0000475758.63709.23) PMID: [26910696](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26910696/)
44. Cohen JL, Scuderi N. Safety and Patient Satisfaction of AbobotulinumtoxinA for Aesthetic Use: A Systematic Review. *Aesthet Surg J.* 2017;37:S32-44. DOI: [10.1093/asj/sjx010](https://doi.org/10.1093/asj/sjx010) PMID: [28388721](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28388721/)
45. Lawrence I, Moy R. An evaluation of neutralizing antibody induction during treatment of glabellar lines with a new US formulation of botulinum neurotoxin type A. *Aesthet Surg J.* 2009;29(6):S66-71. DOI: [10.1016/j.asj.2009.09.009](https://doi.org/10.1016/j.asj.2009.09.009) PMID: [19945007](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19945007/)