TRENDY V TERAPII BOTULISMU

Trends in the therapy of botulism

12: 207–211, 2010
ISSN 1212-4117**Jiří Patočka**

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta, katedra radiologie a toxikologie

Summary

Botulin neurotoxins are etiological agents of botulism, which is a disease manifested by peripheral neuromuscular blockage and characterized by plegia. Botulotoxin is the most toxic known substance. Botulotoxin A is currently in the focus of interest of healthcare professionals, and is employed in a number of clinical applications. It is most frequently used in the treatment of muscle spasticity, hyperhidrosis, focal dysphonias, blepharospasms, hyperactive bladder, pelvic pain syndrome, vasomotorial cephalgia, migraine, achalasia, anal fissures and vaginismus. The most effective protection against the toxin is induction of a protective immunity response through the vaccination. The vaccination with a suitable antigen induces production of neutralizing antibodies, which are bound to the toxin and remove it from the circulation before it is able to enter the nervous cell and block the neurotransmission. However, the application of the vaccine is associated with the problem of the ever more frequent use of botulotoxin in cosmetics and cosmetic medicine, and thus, there is an ever growing proportion of the population having in the blood antibodies against this toxin. Botulotoxin is employed in the treatment of many neuromuscular, autonomous and sensory disorders. New possibilities of the treatment of botulism were recently being searched for.

There are promising substances supporting the release of neurotransmitter or interfering with its bond, translocation and endopeptidase activity of toxins. The natural product triterpenoid toosendanin from the traditional Chinese medicine was shown to exert anti-botulin properties in animal models. Chinese scientists found the compound to be a selective presynaptic blocking agent. Toosendanin was able to protect animals, which were administered with lethal doses of botulotoxin A or B from botulism and to recover the activity of their transmission, even if administered several hours before the death. The present article summarizes the contemporary knowledge of the anti-botulin compound toosendanin.

Key words: botulism – botulotoxin – mechanisms of effect – therapy – toosendanin – natural triterpenoid

Souhrn

Botulinové neurotoxiny jsou etiologickým původcem botulismu, onemocněním projevujícím se periferní neuromuskulární bloádou a charakteristickými obrnami u lidí. Botulotoxin je nejedovatější známou látkou. V současné době je středem zájmu zdravotníků zejména botulotoxin A, který je používán v celé řadě klinických aplikací. Nejčastěji se používá v léčbě svalových spasticit, hyperhidrózy, fokálních dysfonií, blefarospasmů, hyperaktivního měchýře, syndromu pánevní bolesti, tenzní cefaley, migrény, achalázie, análních fisur a vaginismu. Nejúčinnějším prostředkem obrany proti toxinu je vyvolání ochranné imunitní odpovědi prostřednictvím očkování. Očkování vhodným antigenem vyvolá produkci neutralizačních protilátek, které se vážou na toxin a odstraní jej z oběhu dříve, než může vstoupit do nervových buněk a blokovat neurotransmisí. Aplikace vakcíny je však spojena s problémem stále častějšího používání botulotoxinu v kosmetice a kosmetické medicíně, takže stále větší část populace má v krvi protilátky proti tomuto toxinu. Botulotoxin se používá při léčbě mnoha neuromuskulárních, autonomních a senzorických poruch. V poslední době se hledají nové možnosti léčby botulismu.

Slibné jsou látky podporující uvolnění neurotransmiteru nebo interferující s jeho vazbou, translokací a endopeptidázovou aktivitou toxinů. Bylo zjištěno, že přírodní produkt, triterpenoid toosendanin z tradiční čínské medicíny, vykazuje na zvířecích modelech proti-botulinové vlastnosti. Čínští vědci zjistili, že sloučenina je selektivním presynaptickým blokátorem. Toosendanin byl schopen ochránit před botulismem zvířata, kterým byla aplikována smrtelná dávka botulotoxinu A nebo B, a obnovit činnost jejich transmise, i když byl podán několik hodin před smrtí. V tomto článku shrnujeme současné znalosti o anti-botulinové sloučenině toosendaninu.

Klíčová slova: botulismus – botulotoxin – mechanismus účinku – terapie – toosendanin – přírodní triterpenoid

ÚVOD

Prvý popis otravy botulotoxinem pochází od německého lékaře, spisovatele a básníka dr. Justina Christiana Kerner (1786–1862). Ten v r. 1817 referoval o úmrtí člověka, který zemřel za záhadných okolností po požití domácí klobásy (Kerner, 1817). Jako první použil pro tuto intoxikaci termín botulismus (z latinského *botulus* – klobása) a za příčinu smrti považoval toxické působení přemíry mastných kyselin. Bakterii *Clostridium botulinum* jako původce botulismu poprvé izoloval až v r. 1897 žák Roberta Kocha, Pierre Marie van Ermengem (1851–1932). V r. 1920 se podařilo Hermannu Sommerovi izolovat čistý botulotoxin typu A a v r. 1949 Burgen objasnil mechanismus jeho působení (Burgen et al., 1949) bloádou nervosvalové ploténky.

Botulinové toxiny tvoří skupinu sedmi imunologicky odlišných proteinů, z nichž pro člověka jsou nebezpečné zejména botulotoxin A, B a E a pro zvířata C a D. Jejich molekula je složena ze dvou podjednotek, lehkého (L) a těžkého (H) peptidového řetězce, které jsou navzájem propojeny disulfidickým můstkem (Patočka, Šplího 2002). V klinické praxi byl botulotoxin poprvé využit v r. 1981 anglickým oftalmologem Alanem Scottem v léčbě strabismu (Scott, 1981). Prvé práce o mimořádné toxicitě botulotoxinu a možnosti jeho použití jako biologické zbraně se začínají objevovat koncem minulého století (Howe, 1992; Cole, 1996; Steffen et al., 1997) a potvrzuje se, že některé země jej v minulosti měly ve své výzbroji (Zilinskas, 1997). Krátce nato se objevují informace o tom, že botulotoxin je předmětem zájmu teroristických skupin (Leggiadro, 2000). Při mimořádné toxicitě botulotoxinu (Schechter, Arnon, 2000) nelze toto nebezpečí podceňovat (Broussard, 2001; Sotos, 2001; Greenfield et al., 2002; Bossi, Bricaire, 2003; Shukla, Sharma, 2005; Patočka, Středa,

2006). I když se dnes botulotoxin používá převážně v medicíně a v kosmetice k vyhlazování vrásek, stejně tak dobře by mohl být zneužit k vyhlazování lidí.

Klinický obraz otravy botulotoxinem

Botulismus nejčastěji vzniká alimentární nákazou po požití nedokonale tepelně opracovaných výrobků. Protože botulotoxin vytváří ve střevě komplex s hemaglutininem a dalšími netoxickými proteiny (Pickett, Perrow, 2009), je chráněn před působením trávicích enzymů a může tak snáze pronikat střevní stěnou (Matsumura et al., 2008). Přirozený botulismus je vzácné, ale závažné paralytické onemocnění. Botulotoxin A je nejúčinnější známý jed, který u člověka blokuje nervové funkce a vede k respiračnímu a svalově-kosternímu ochrnutí. V organismu působí tak, že blokuje uvolňování acetylcholinu z nervových zakončení, a tak zastavuje jejich činnost (Dressler et al., 2005).

Klasický obraz alimentárního botulismu se v závislosti na dávce začíná rozvíjet po 12–36 hodinách po intoxikaci. Časnými projevy jsou bolesti hlavy a končetin, suchost v ústech, nauzea a zvracení. Botulismus postihuje nervový systém a způsobuje dočasnou obrnu různých částí těla. Proto krátce nato dochází k paréze okohybných svalů, dvojitému vidění a zástavě střevní peristaltiky. Následují polykací potíže, dysartrie, dušnost a parézy končetinových svalů. Objevují se poruchy autonomní inervace, jako jsou mydriáza, arytmie, retence moči a obstrukce (Patočka et al., 2006). V závažnějších případech může dojít k respiračnímu selhání. V závislosti na dávce trvají symptomy několik dnů až týdnů a pomalu ustupují v opačném pořadí, než v jakém se začaly projevovat. Z hlediska léčebného odeznívají symptomy lehkých otrav spontánně, u těžkých je většinou nutná intenzivní péče a nezřídka i umělá plicní ventilace.

Struktura botulotoxinu a mechanismus toxického účinku

Molekula botulotoxinu sestává ze dvou nestejně velkých proteinových řetězců. Z těžkého řetězce (H-chain) o molekulové hmotnosti 100 000 Da a lehkého řetězce (L-chain) s molekulovou hmotností 50 000 Da. Oba řetězce jsou v bakterií syntetizovány odděleně, ale působením klostridiové proteázy dojde k jejich spojení do jedné molekuly. Aby se z něj stal aktivní neurotoxin, je nutná jeho aktivace. Nejprve dojde k přerušení řetězce mezi aminokyselinami 448 a 449. Lehký řetězec (aminokyseliny 1–448) zůstane spojen s těžkým řetězcem (aminokyseliny 449–1295) pouze disulfidickým můstkem. V této podobě toxin proniká přes terminální axon do neuronů, kde po jeho internalizaci dojde k redukci disulfidu.

Na základě znalosti sekvencí aminokyselin v obou řetězcích byla vytvořena hypotéza existence tří prostorově oddělených a funkčně odlišných částí toxinu – domén (Fischer et al., 2008). Translokační doména umožňuje vstup toxinu přes buněčnou membránu do cytosolu tím, že deformuje její strukturu. Vazebná doména obsahuje specifické terminální C-řetězce, které jsou zodpovědné za specifickou vazbu toxinu k receptoru buněčné stěny presynaptického vlákna. Význam katalytické domény není jasný, předpokládá se její role v adherenci toxinu k buněčné stěně, což následně vyvolá aktivaci translokační domény (Baldwin, Barbieri, 2009).

Mechanismus účinku botulotoxinu je možné shrnout do tří fází: vazba na receptor – tj. na presynaptickou část nervosvalové ploténky; internalizace – průnik toxinu přes membránu dovnitř nervového zakončení; blokáda uvolňování acetylcholinu. Tím je narušena funkce nervosvalové ploténky, tj. není umožněn přenos vzruchu na cílový orgán – sval. Tento děj je ireverzibilní, ale pomalý. Účinek botulotoxinu se projeví po 2–3 dnech od aplikace a maximálního uvolnění svalového tonu se dosáhne za 2–3 týdny. Botulotoxin působí po dobu 3–4 měsíců, dokud nervová zakončení nevytvoří nová signální spojení se svaly (Stenmark et al., 2008).

Možnosti prevence a terapie

Otrava botulotoxinem může skončit smrtí zadušením a specifická antidotní terapie neexistuje. Jako vhodná prevence před botulismem je vakcinace vhodnou toxoidovou vakcínou, která je

vyvíjena zejména v souvislosti s možností zneužití botulotoxinu jako toxinové zbraně (Smith, 2009). Tato vakcína však není určena a ani doporučena pro běžnou imunizaci osob. Dostatečná ochrana totiž nastupuje až po několika měsících po započetí aktivní imunizace (Patočka, Šplího, 2002). V České republice není tato vakcína dostupná a není ani registrována SÚKL.

Jinou možností ochrany je pasivní imunizace za použití trivalentního koňského antitoxinu (proti sérotypům A, B a E). Přibližně u 2–9 % osob existuje přecitlivělost na antitoxin. Podávání antibiotik nenapomáhá průběhu onemocnění a některá z nich dokonce účinek botulotoxinu posilují. Vzhledem k dlouhé inkubační době nemá výplach žaludku a střev větší význam. U mírně probíhajících onemocnění se parézy léčí stoupajícími dávkami strychninu. Při polykacích a dechových potížích je nezbytná hospitalizace na resuscitačním oddělení a řízené dýchání postiženého spojené s intenzivní lékařskou péčí. V případě masového výskytu otrav a zejména v případě teroristického zneužití botulotoxinu (Patočka et al., 2006) by počty intoxikovaných mohly dosáhnout několika stovek obětí, a pak by tento způsob péče o pacienty mohl zkolabovat (Patočka, Středa, 2006).

Perspektivy

Potřeba nalezení účinného a jednoduše aplikovatelného léčivého přípravku je stále aktuální. Zdá se, že takovým prostředkem by mohl být přírodní triterpenoid z indomalajského tropického stromu *Melia dubia* Cav. alias *Melia toosendan* Sieb et Zucc (syn. *Melia azedarach* L.) nazvaný toosendanin (obr. 1) (Koul et al. 2002). Listy tohoto až 25 m vysokého stromu z čeledi Meliaceae (zederachovité) (obr. 2) jsou součástí tradiční čínské medicíny. Toosendanin je sekundární metabolit, sloučenina ze skupiny limonoidů. Tyto látky mají celou škálu biologických aktivit. Vykazují např. insekticidní, baktericidní či fungicidní vlastnosti. Toosendanin patří mezi allelochemikálie, konkrétně mezi allomony, tedy látky, kterými se rostlina brání před okusem predátory, zejména hmyzem, a působí tedy jako pesticid (Koul et al., 2002). Nedávno však bylo zjištěno (Li, Shi, 2004), že toosendanin je agonistou napětově řízených kalciových kanálů typu L a antagonizuje účinek botulotoxinu typu A (Zhou et al., 2003). Na laboratorním modelu potkana intoxikovaného botulotoxinem byl

prokázán terapeutický účinek toosendaninu (Shi, Wang, 2004). Přesný mechanismus účinku toosendaninu není znám, ale určitě hraje roli to, že toosendanin brání botulotoxinu vytvářet

v membránách póry (Li, Shi, 2006). Toosendanin také blokuje přesun lehkého řetězce botulotoxinu přes těžký řetězec v kanálu neuronu (Fischer et al., 2009).

Obr. 1. Chemická struktura toosendaninu, triterpenoidu z indomalajského tropického stromu *Melia dubia* Cav.

Obr. 2. Kvetoucí strom *Melia dubia* Cav. z čeledi Meliaceae, který je domovem v celé indomalajské oblasti až po Austrálii a jehož listy jsou používány v tradiční čínské medicíně.

Zdroj: Použitý snímek z Pianta e Animali Italiani (http://images.google.cz/imgres?imgurl=http://lh6.ggpht.com/luirig/R5xYv5TeIJI/AAAAAAAAJbM/4Yja8zq4Ec8/s800/melia_azedarach_17.jpg&imgrefurl=http://digilander.libero.it/felrig/photos//melia_azedarach.htm&usq=__y2S1a_E_PygR-Di8ukmKynnRGi3Gs=&h=500&w=750&sz=103&hl=cs&start=46&itbs=1&tbnid=iXvgO2kRQY9A3M:&tbnh=94&tbnw=141&prev=/images%3Fq%3Dmelia%2Bdubia%26start%3D36%26hl%3Dcs%26sa%3DN%26ndsp%3D18%26tbs%3Disch:1).

LITERATURA

- BALDWIN, M. R., BARBIERI, J. T.: Association of botulinum neurotoxins with synaptic vesicle protein complexes. *Toxicon*. 2009, vol. 54, no 5, s. 570–574.
- BOSSI, P., BRICAIRE, F.: Botulism toxin, bioterrorist weapon. *Presse Med.* 2003, vol. 32, no 10, s. 463–465.
- BROUSSARD, L. A.: Biological agents: weapons of warfare and bioterrorism. *Mol Diagn.* 2001, vol. 6, no 4, s. 323–333.
- BURGEN, A., DICKENS, F., ZATMAN, L. J.: The action of botulinum toxin on the neuromuscular junction. *J Physiol.* 1949, vol. 109, no 1–2, s. 10–24.
- COLE, L. A.: The specter of biological weapons. *Sci. Am.* 1996, vol. 275, no 6, s. 60–65.
- DRESSLER, D., SABERI, F. A., BARBOSA, E. R.: Botulinum toxin: mechanisms of action. *Arq Neuropsiquiatr.* 2005, vol. 63, no 1, s. 180–185.
- FISCHER, A., MUSHRUSH, D. J., LACY, D. B., MONTAL, M.: Botulinum neurotoxin devoid of receptor binding domain translocates active protease. *PLoS Pathog.* 2008, vol. 4 no 12: e1000245.
- FISCHER, A., NAKAI, Y., EUBANKS, L. M. et al.: Bimodal modulation of the botulinum neurotoxin protein-conducting channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009, vol. 106, no 5, s. 1330–1335.
- GREENFIELD, R. A., BROWN, B. R., HUTCHINS, J. B. et al.: Microbiological, biological, and chemical weapons of warfare and terrorism. *Am. J. Med. Sci.* 2002, vol. 323, no 6, s. 326–340.
- HOWE, E. G.: Medicine and war. *N. Engl. J. Med.* 1992, vol. 327, no 15, s. 1098.
- KERNER, J. C.: Vergiftung durch verdorbene Würste. *Tübinger Blätter Naturwiss. Arzneim.* 1817, vol. 3, s. 1–45.
- KOUL, O., MULTANI, J. S., SINGH, G., WAHAB, S.: Bioefficacy of toosendanin from *Melia dubia* (syn. *M. azedarach*) against gram pod-borer, *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Curr. Sci.* 2002, vol. 83, no 11, s. 1387–1391.
- LEGGIADRO, R. J.: The threat of biological terrorism: a public health and infection control reality. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 2000, vol. 21, no 1, s. 53–56.
- LI, M. F., SHI, Y. L.: Toosendanin, a triterpenoid derivative, acts as a novel agonist of L-type Ca^{2+} channels in neonatal rat ventricular cells. *Eur. J. Pharmacol.* 2004, vol. 501, no 1–3, s. 71–78.
- LI, M. F., SHI, Y. L.: Toosendanin interferes with pore formation of botulinum toxin type A in PC12 cell membrane. *Acta Pharmacol. Sin.* 2006, vol. 27, no 1, s. 66–70.
- MATSUMURA, T., JIN, Y., KABUMOTO, Y. et al.: The HA proteins of botulinum toxin disrupt intestinal epithelial intercellular junctions to increase toxin absorption. *Cell. Microbiol.* 2008, vol. 10, no 2, s. 355–364.
- NAKAI, Y., TEPP, W. H., DICKERSON, T. J., JOHN-SON, E. A., JANDA, K. D.: Function-oriented synthesis applied to the anti-botulinum natural product toosendanin. *Bioorg. Med. Chem.* 2009, vol. 17, no 3, s. 1152–1157.
- PATOČKA, J., KUČA, K., JUN, D.: Botulinum toxin: bioterror and biomedical agents. *Def. Sci. J.* 2006, vol. 56, no 2, s. 189–197.
- PATOČKA, J., STŘEDA, L.: Protein biotoxins of military significance. *Acta Medica.* 2006, vol. 49, no 1, s. 3–11.
- PATOČKA, J., ŠPLÍNO, M.: Botulinum toxin: from poison to medicinal agent. *ASA Newsletter.* 2002, vol. 88, s. 14–19.
- PATOČKA, J., ŠPLÍNO, N., MĚRKA, V.: Botulism and bioterrorism: how serious is this problem? *Acta Medica.* 2005, vol. 48, no 1, s. 23–28.
- PICKETT, A., PERROW, K.: Composition and molecular size of Clostridium botulinum Type A toxin-hemagglutinin complex. *Protein J.* 2009, vol. 28, no 5, s. 248–249.
- SCOTT, A. B.: Botulinum toxin injection of eye muscles to correct strabismus. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 1981, vol. 79, s. 734–770.
- SHI, Y. L., WANG, Z. F.: Cure of experimental botulism and antibotulismic effect of toosendanin. *Acta Pharmacol. Sin.* 2004, vol. 2, no 5, s. 839–848.
- SHUKLA, H. D., SHARMA, S. K.: Clostridium botulinum: a bug with beauty and weapon. *Crit. Rev. Microbiol.* 2005, vol. 31, no 1, s. 11–18.
- SCHECHTER, R., ARNON, S. S.: Extreme potency of botulinum toxin. *Lancet.* 2000, vol. 355, no 9199, s. 237–238.
- SMITH, L. A.: Botulism and vaccines for its prevention. *Vaccine.* 2009, vol. 27, suppl. 4, s. 33–39.
- SOTOS, J. G.: Botulinum toxin in biowarfare. *JAMA.* 2001, vol. 285, no 21, s. 2716.
- STEFFEN, R., MELLIN, J., WOODALL, J. P. et al.: Preparation for emergency relief after biological warfare. *J. Infect.* 1997, vol. 34, no 2, s. 127–132.
- STENMARK, P., DUPUY, J., IMAMURA, A., KISO, M., STEVENS, R. C.: Crystal structure of botulinum neurotoxin type A in complex with the cell surface coreceptor GT1b-insight into the toxin-neuron interaction. *PLoS Pathog.* 2008, vol. 4, no 8, s. e1000129.
- ZHOU, J. Y., WANG, Z. F., REN, X. M., TANG, M. Z., SHI, Y. L.: Antagonism of botulinum toxin type A-induced cleavage of SNAP-25 in rat cerebral synaptosome by toosendanin. *FEBS Lett.* 2003, vol. 555, no 2, s. 375–379.
- ZILINSKAS, R. A.: Iraq's biological weapons. The past as future? *JAMA.* 1997, vol. 278, no 5, s. 418–424.

Jiří Patočka
prof.patočka@gmail.com