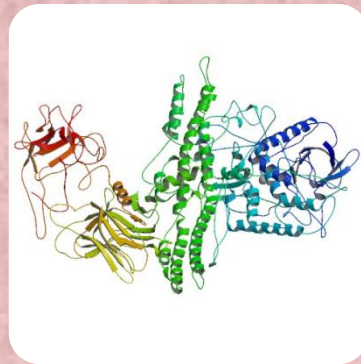


БОТУЛИНОВ НЕВРОТОКСИН – от отровата до лекарството



доц. Нели Ерменлиева, д.б.

Катедра „Предклинични и клинични науки”

Медицински университет - Варна



Съдържание

Глава първа.

Исторически преглед.

Глава втора.

***Clostridium botulinum*, ботулизъм и ботулинов невротоксин.**

2.1. *Clostridium botulinum*

2.2. Ботулизъм

2.3. Епидемиологична характеристика

2.4. Ботулинов невротоксин

Глава трета.

Приложение на ботулинов невротоксин в клиничната практика.

3.1. Предимства като терапевтичен агент

3.2. Продукция на ботулинов токсин за клинична употреба

3.3. Лекарствени препарати, съдържащи ботулинов невротоксин

3.4. Терапевтични индикации

3.5. Имуногенност

3.6. Ефективност и безопасност

3.7. Продължителност на терапевтичното действие

Глава четвърта.

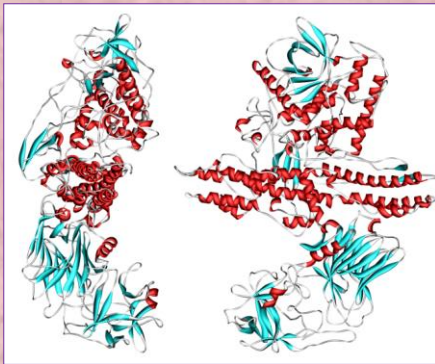
Ботулинов невротоксин в контекста на биотероризма.



Въведение.

Токсините са отровни субстанции от **растителен или животински произход**, често продуцирани от микроорганизми и действащи като **антиген** в тялото. Те са в състояние да причинят заболяване, страдание и смърт при въвеждане в организма.

Ботулиновият невротоксин е най-силно токсичната позната биологична субстанция. Продуцира се от спорообразуващи анаеробни бактерии от род *Clostridium*, които причиняват заболяването **ботулизъм**. Хранителната форма на ботулизъм вероятно съществува от самото зараждане на човечеството.



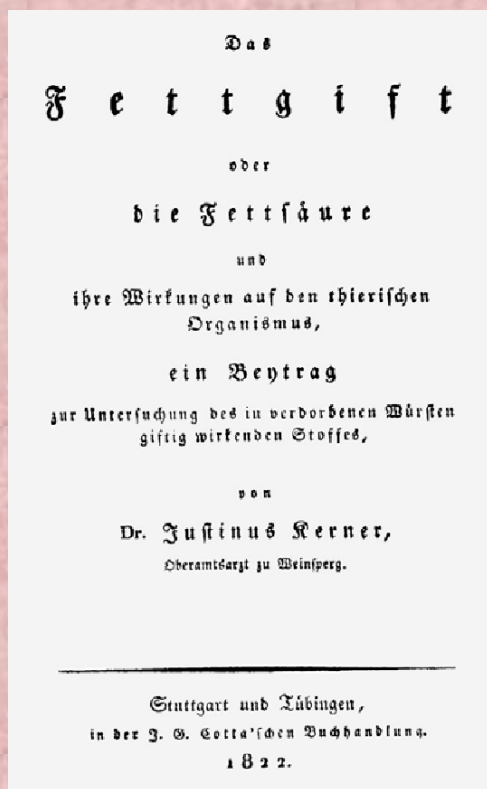
Фиг. 1. Молекулярна структура на ботулинов токсин (Tun A) (Chris Colby, 2014)



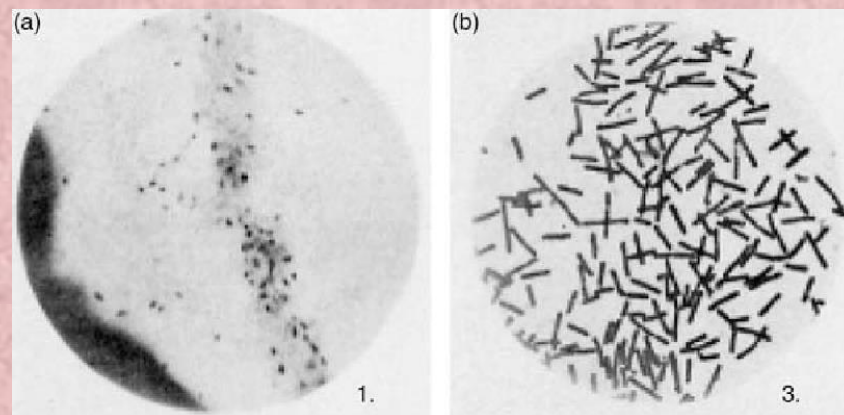
Фиг. 2. Цветна микрограма на *Clostridium botulinum* (James Cavallini, Science Source)

Глава 1. Исторически преглед.

Написани са голям брой научни доклади свързани с *Clostridium botulinum* и продуцирания от него ботулинов токсин. Значително по-оскъдна е наличната литература с „поглед назад във времето”, към **първите изследователи** заели се с не леката за времето си задача да проучат невротоксина, неговата същност и действие.



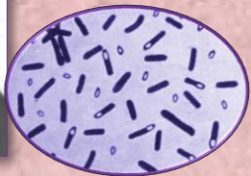
Фиг. 3 Монография на д-р Ю. Кернер



Фиг. 4 Микроскопия на заразена шунка при огнище на ботулизъм в Ellezelles (от van Ermengem, 1897).

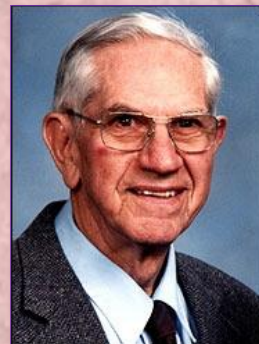


1895 г.

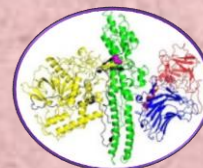


Фиг. 6. Emile van Ermengem
(1851 - 1932)

Изолира и описва *Clostridium botulinum*
като бактериалния източник на BoNT

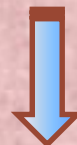


Фиг. 7. Edward Schantz
1908 - 2005



1946 г.

Изолира BoNT в
чиста кристална
форма



Фиг. 8. Alan Scott

Първо клинично
приложение на BoNT за
лечение на страбизъм

1973 г.



1820 г.



Фиг. 5. Justinus Kerner
(1786-1862)

Изолира BoNT от наденица
("botulus" лат. – наденица)



Фиг. 9. Jean Carruthers и
Alastair Carruthers

За пръв път прилага BoNT за
естетически цели



1987 г.

1.1. Юстинус Кернер, „наденичната отрова“ и първото описание на ботулиновия невротоксин

Едно от първите подробно документирани епидемични огнища на ботулизъм се развива през *1793 година в Германия*. Описани са клинични случаи на *13 пациенти*, диагностицирани с *хранително отравяне* с изявена характерна симптоматика за ботулизъм. Заразените населяват малко село в *Югозападна Германия, Вилдбат* и след неуспешно лечение, изходът от заболяването за *шест от тях е летален*.

През 1811 година в Кралство Вюртемберг, Щутгарт са докладвани още заразени пациенти, заболяването е наречено „*наденичната отрова*“, тъй като се асоциира с консумация на наденица.



Фиг. 10. Bad Wildbad, Germany



Фиг. 11. Bad Wildbad, Germany

1.1. Юстинус Кернер, „наденичната отрова“ и първото описание на ботулиновия невротоксин

Проведена е *научна дискусия*, на която за пръв път се използва терминът *„наденична отрова“*, както и мнението, че фаталната болест е причинена от консумация на *„Blunzen“* – наденица от свински стомах, пълен с кръв, различни видове месо и подправки.

Кралското правителство на Вюртенберг в Щутгарт издава публично предупреждение за *„вредата от консумацията на пушена наденица, кървавица“*.



Фиг. 12. Blunzen



Фиг. 13. Blunzen

1.1. Юстинус Кернер, „наденичната отрова“ и първото описание на ботулиновия невротоксин

Юстинус Кернер е роден е в Лудвигсбург, Вюртемберг. Той е *немски лекар, поет и писател на медицинска литература*.

През 1815 година 29-годишният млад лекар Ю. Кернер съобщава на здравните служби за смъртоносни хранителни отравяния, които през 1817 година той описва и публикува в *„Тюбингенски документи по природни науки и фармакология“* (Kerner J: *Vergiftung durch verdorbene Würste. Tübinger Blätter für Naturwissenschaften und Arzneykunde, 1817; 3:1-25*).

През 1821 година д-р Ю. Кернер започва *експерименти с животни* в лабораторията на местния фармацевт с амбицията да извлече и изолира неизвестната токсична субстанция. В периода 1820–1822 година той събира повече случаи и ги публикува в *две монографии*, в която описва *„наденичното отравяне“*. Монографиите включват *231 клинични случаи* и дават пълно описание на симптоматиката, която днес съвременната медицина асоциира с ботулизъм.



Фиг 14. Юстинус Кернер
(1786-1862)

1.1. Юстинус Кернер, „наденичната отрова“ и първото описание на ботулиновия невротоксин

Д-р Кернер: „Токсинът довежда нервната система в състояние, при което влиянието му върху химичния процес на живота е прекъснато. Капацитетът на нервната проводимост се прекъсва от токсина по същия начин, както този в електрическия проводник при поява на ръжда“.

В кулминацията на своите изследвания Кернер провежда рискови експерименти върху самия себе си. Той съобщава: „Няколко капки от „наденичната киселина“, поставени върху езика, предизвикват усещане за свиване и задушаване в района на ларинкса. Чувство, което също така се забелязва след поглъщане на меконова киселина или йод. След по-силно въздействие настъпва усещане за безпокойство, напрежение в клепачите, очите са отпуснати, усеща се леко изгаряне в уретрата, гладка болка в стомаха, запек и много сухи длани и стъпалата. Усещането за изсъхване на гърлото изчезва периодично, но отново се връща заедно с чувството на напрежение в клепачите“ (Kerner, 1822).

Die Fettsäure oder zoonische Säure; in solchen Gaben gereicht, daß ihre Wirkung auf die Epithel des sympathischen Nervensystems hauptsächlich beschränkt bleibt, möchte in den vielen Krankheiten, die aus Aufreizung dieses Systems entstehen, von Nutzen seyn.

Offenbar wirkt dieses Gift vor vielen hauptsächlich auf das sympathische Nervensystem lähmend, seine Thätigkeit hemmend, ein. Eine Menge Krankheiten aber haben wir bestimmt nur dadurch, daß wir die so oft durch Nahrungsmittel, Miasmen, atmosphärische Einwirkungen u. s. w. entstandene Aufreizung des sympathischen Nervensystems hemmen, das in ihm zu sehr erregte Nervenfliuidum gleichsam binden.

Es käme bei Anwendung dieses Mittels natürlich immer auch sein schädlicher Einfluß auf die Schlingwerkzeuge und die Lungenerven in Betracht, Wirkungen, die wir ja aber auch bei vielen andern unter der Hülfe der Heilmittel aufgenommenen Giften zu beachten haben.

Was aber hier über die Fettsäure als mögliches Heilmittel gedauert wurde, gehört allerdings nur in das Reich der Hypothesen, und kann nur von berechnigten Beobachtungen bestätigt oder widerlegt werden.

"Маснатата" или "зоонична" киселина, прилагана в определени количества, има ограничен ефект, главно в рамките на симпатиковата нервна система. Тя би могла да има ползотворен ефект при голям брой заболявания, които произтичат от хипервъзбудимост на тази система. Очевидно, тази отрова има предимно парализиращ ефект върху симпатиковата нервна система¹, ннхибираща дейността ѝ. Все пак ние сме длъжни да облекчим хипервъзбудимостта при много заболявания само чрез ннхибиране на симпатиковата нервна система, която често е резултат от храна, миазма², атмосферни влияния и т.н., в случаи на прекалено раздразнена нервна течност³.....

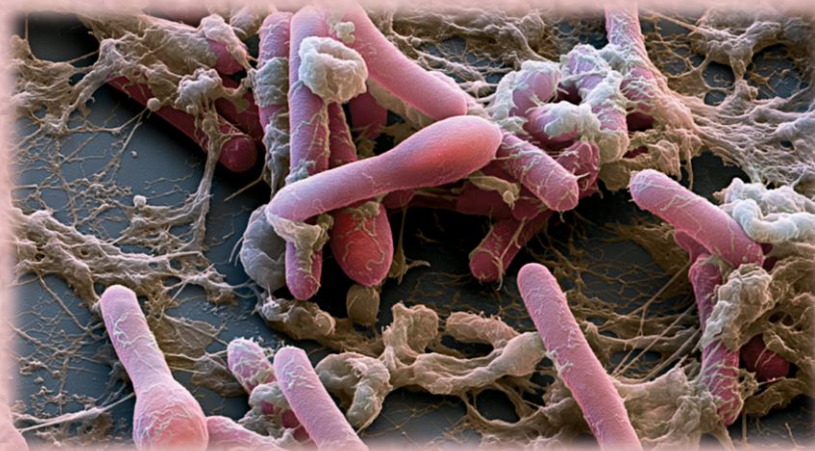
"С прилагането на това вещество, неговото вредно влияние върху преглъщането и белите дробове води до извода, че действието, което наблюдаваме при заразяване, е сходно с това на много други токсини, адаптирани като средства за лечение. Споменатото тук за маснатата киселина като потенциално средство за защита, все още е в сферата на хипотезите, и може да бъде доказано или отхвърлено само от съответните наблюдения".

Фиг. 15. Цитат от втората монография на Юстинус Кернер (Kerner, 1822)

1.1. Юстинус Кернер, „наденичната отрова“ и първото описание на ботулиновия невротоксин

Въпреки че Кернер не успява да изолира ботулиновия токсин в чиста форма, той *описва изключително точно неговото действие* и е признат за *„интелектуален подбудител на съвременната терапия с ботулинов токсин“* (Erbguth & Naumann, 1999). След публикациите му в периода 1817–1822 Кернер става известен като експерт по „отравяне с наденица“ и го наричат „Вурст–Кернер“ или „Кернер-наденицата“, а ботулизмът дълго е назоваван *„болест на Кернер“*.

Още 70 години ще изминат, преди токсинът, продуциран от *Clostridium botulinum*, да бъде открит в парче замърсена шунка и наречен с латинската дума за наденица *„botulus“*, почитайки усърдната работа на този учен и визионер.

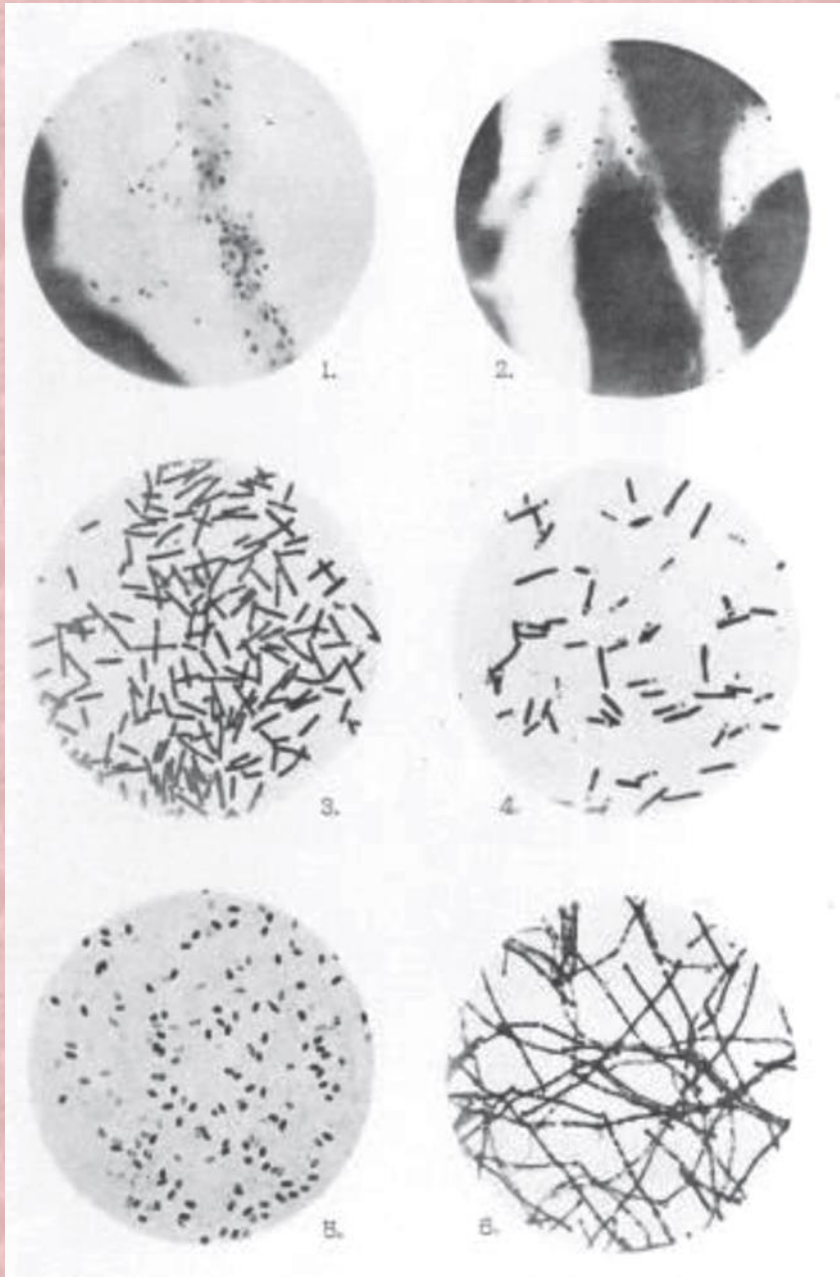


Фиг. 16. *Clostridium botulinum*

1.2. Емил ван Ерменгем и „*Bacillus botulinus*“

На 14 декември **1895 година** в малко белгийски село *Елезелес*, източно от град Ренекс (Ронс), избухва **ботулинова епидемия**. Музиканти от местен духов оркестър „*The Fanfare Royale Les Amis Réunis*“ свирят на погребението на 87-годишния Антоан Кристур, след което обяждат в хан "*Le Rustic*". **Тридесет и четири души консумират маринована пушена шунка**, след което музикантите и гостите получават симптоми на **мидриаза, диплопия, дисфагия, дизартрия, последвани от мускулна парализа**. Трима от тях умират в рамките на 5 до 7 дни, десет души са в много тежко състояние.

Извършена е аутопсия на починалите и **анализ на шунката от микробиолога Емил Пиер Мари ван Ерменгем от Университета в Гент**. В хистологичните проби от участъци от далака на жертвите, той диагностицира голям брой микроорганизми. Ван Ерменгем провежда първото успешно изолиране на *Clostridium botulinum* и доказва **анаеробното култивиране** на бактериите и способността им да се размножава в **консервирана храна**. Той, също така, доказва експериментално, че ботулиновият бактерий продуцира **силен токсин, който нарича „ботулинов токсин“**.



Фиг. 17. Емил Пиер Мари ван Ерменгем

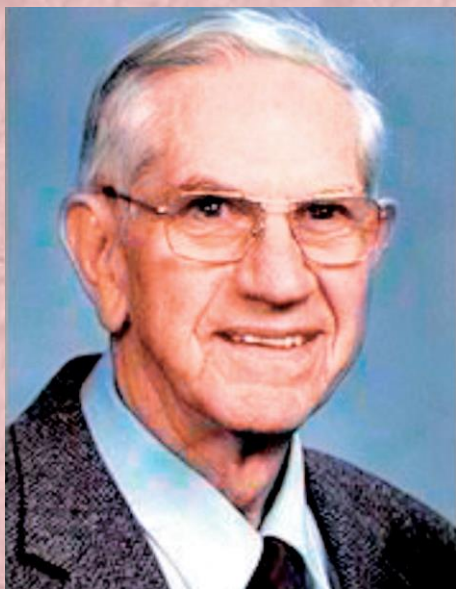
Фиг. 18.

1. Хистология на съмнителната шунка. Многобройни спори сред мускулните влакна. Ziehl $\times 1000$.
2. Хистология на съмнителната шунка. Мускулна тъкан до костна тъкан.
3. *Bacillus botulinus*. Култура в желатин и глюкоза. Осми ден. Възрастни форми.
4. *Bacillus botulinus*. Същата култура. Форми със спори. $\times 1000$.
5. *Bacillus botulinus*. Същата култура след 4 седмици. Свободни спори. $\times 1000$.
6. *Bacillus botulinus*. Култура в бульон и глюкоза при 38.5°C след 48 часа. $\times 1000$ (Ermengem, 1897).

1.3. Едуард Шанц и Алан Скот за „чистата кристална форма“ в терапията на страбизъм

Един от учените със значителен принос към получаване на първата **чиста кристална форма** на ботулиновия невротоксин е **д-р Едуард Шанц**. Той разработва първата чиста кристална форма на токсина, **одобрена за приложение върху хора**. Събитията, които довеждат до използването на токсина за тази цел, са инициирани от **д-р Алан Скот**, очен хирург в Института за очни изследвания "Smith-Kettlewell" в Сан Франциско, Калифорния. Той изследва вещества, които имат потенциал, **инжектирани в хиперактивни очни мускули на пациенти страдащи от страбизам**, да коригират положението на очите. Алан Скот проявява интерес към ботулиновия токсин като потенциален инжекционен терапевтичен агент и в края на 60-те години той се свързва с д-р Шанц. Той предоставя на Алан Скот **пречистен ботулинов токсин тип А** и не след дълго хирургът съобщава, че токсинът е в състояние да **коригира кривогледство в опитни животни**.

През 1980 година д-р Алан Скот за първи път прилага ботулинов токсин тип А на пациент за терапия на кривогледство, а през 1989 година FDA одобрява ботулиновия токсин като лекарство наречено "**Oculinum**" за лечение на **страбизъм, блефароспазм и хемифациален спазъм**.



Фиг. 19. Едуард Шанц



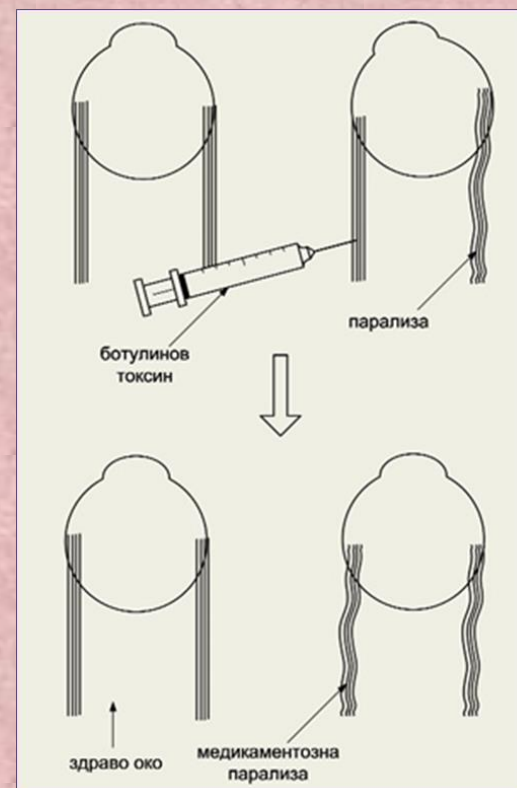
Фиг. 20. Алан Скот

Д-р Шанц описва как се заражда интересът му към невротоксина (Schantz & Johnson, 1997):

„Първата ми истинска среща с токсина датира от 1944 година, когато бях назначен като **млад офицер от армията, обучен по биохимия**, на длъжност във „Форт Детрик“, заедно с бактериолози и лекари, за да проучим естеството на ботулиновите токсини. Пречистването на тези токсини е една от **първите цели на научноизследователската програма**.

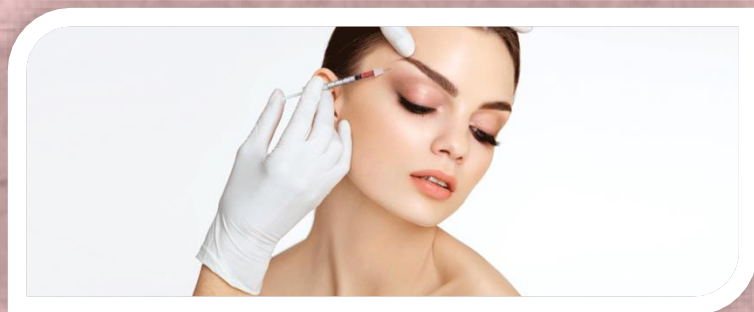
Трябва да се има предвид, че получените токсини не са разработени с цел използване за незаконни или убийствени цели“

Инжектирането на ботулинов токсин в **антагонист на парализиран очен мускул** води до поява на **временна парализа** и впоследствие **възстановяване на мускулния баланс**. След преминаване на придобитата и индуцирана мускулна парализа се постига **нормална подвижност на окото**.



Фиг. 21. Приложение на ботулинов токсин при страбизъм

1.4. Джийн и Алистър Карутърс и ТОКСИНЪТ в полза на красотата



Фиг. 22.



Фиг. 23. Джийн Карутърс (вляво) и Алистър Карутърс (вдясно)

През 1987 година офталмологът Джийн Карутърс прилага ботулинов невротоксин-съдържащ препарат в челото на пациент за терапия на **блефароспазъм**. След процедурата ѝ прави впечатление **заличаването на бръчките на пациента в периорбиталната област**. Съпругът ѝ, дерматологът Алистър Карутърс наблюдава същите изменения в свои пациенти, на които е прилагал токсина за лечение.

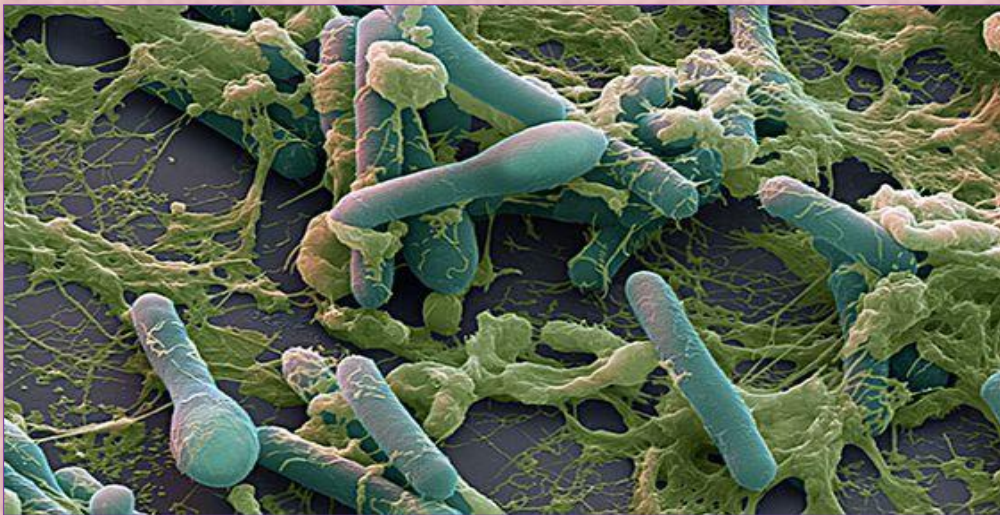
На следващия ден д-р Джийн Карутърс **инжектира токсина на своята рецепционистка Кати Бикъртън, с цел заличаване на глабеларни бръчки** и осъществява **първото използване на ботулиновия токсин (тип А) за естетически цели**. Днес двамата лекари работят усилено за популяризиране на токсина за естетически цели, като провеждат обучения на медицински персонал в много страни по света.

Глава 2. Clostridium botulinum,
ботулизъм и ботулинов невротоксин.

2.1. *Clostridium botulinum*

Род *Clostridium* са грам-положителни пръчковидни бактерии. Представяват **спорообразуващи анаеробни бактерии**, които при човека причиняват заболяванията **ботулизъм, тетанус, газова гангрена, псевдомембранозен колит** и други. При повечето от тях е доказана продукцията на токсини.

Clostridium botulinum е **разпространен повсеместно**, среща се в почви, тиня и животинските изпражнения, колонизира гастроинтестиналния тракт на птици и бозайници. Микроорганизмите, в рамките на вида, се различават по антигенния тип на токсините, които продуцират. **Спората е разположена терминално**, придобитата форма се асоциира с „ракета за тенис“.



Фиг. 24. Сканирана електронна микрограма на *Clostridium botulinum*



Фиг. 25. Колонии на *Clostridium botulinum* в хранителна среда

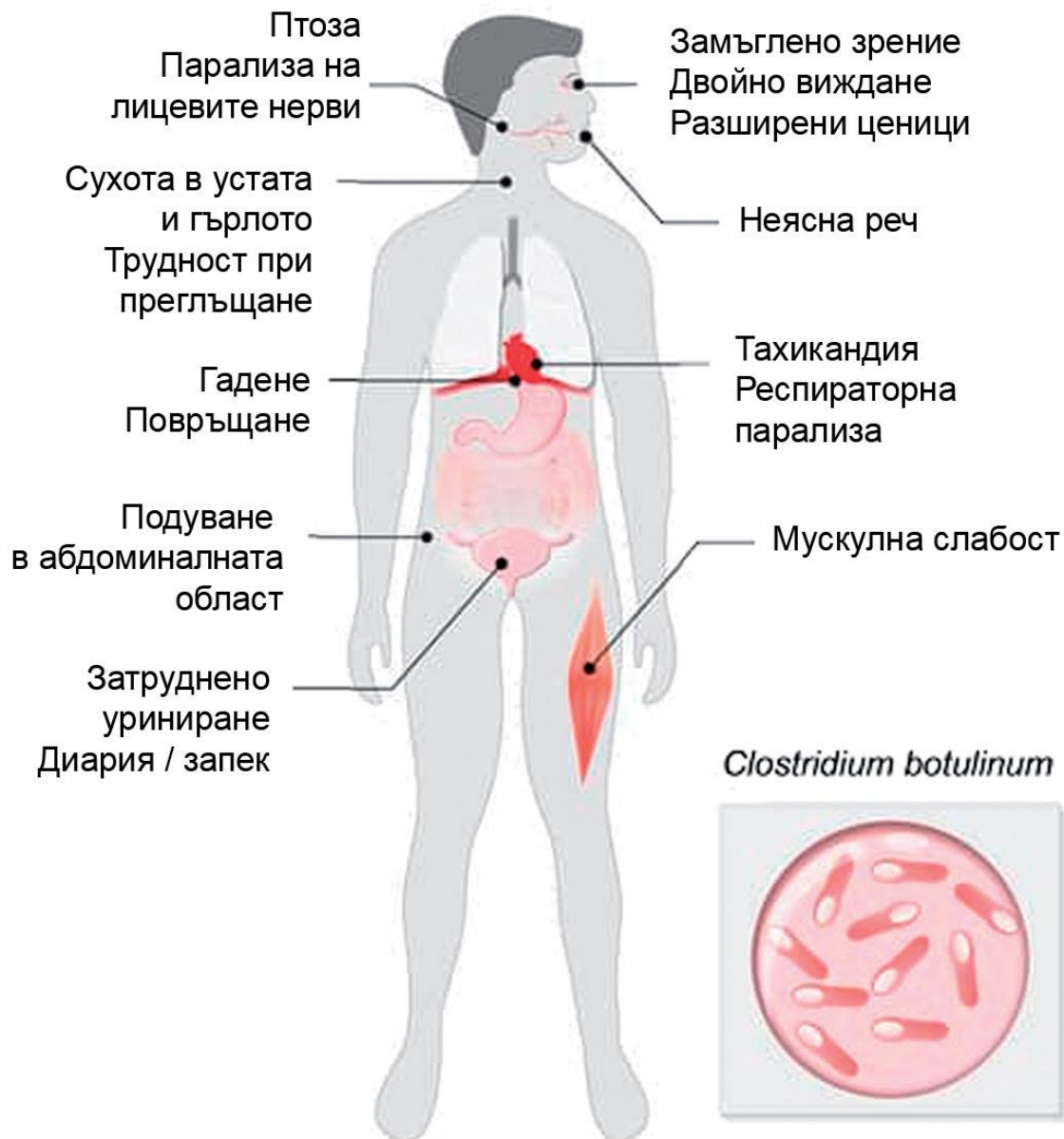
2.2. Ботулизъм

- Ботулизмът е *интоксикация*:
- Настъпва след консумация на храна, съдържаща *ботулинов екзотоксин*;
- При размножаване на *C. botulinum* в рани;
- При бебета погълнали спори на *C. botulinum* с контаминирана кърма, подсладена с мед вода и др.

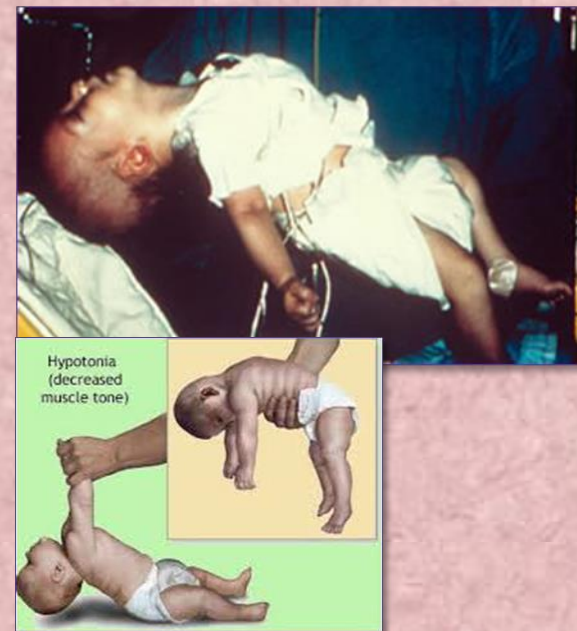
- Няколко *нанограма от токсина* могат да причинят заболяването.

- Симптоматиката се характеризира със *симетрична, десцендентна парализа*, засягаща двигателни и автономни нерви, като обикновено започва в рамките на черепните нерви.
- При тежките случаи прогресивната парализа на дихателните мускули води до *асфикция и смърт*.
- *Спиране на сърдечната дейност* също може да е причина за смърт.
- Рядко се наблюдава *треска и делириум*, при летален изход пациентите остават в съзнание почти до настъпване на смъртта.

2.2.1. Клинична картина



Фиг. 26. Симптоматика на ботулизъм



Фиг. 27. Хипотония при кърмачески ботулизъм



Фиг. 28. Птоза на клепачите при пациент с ботулизъм

Табл. 1. Заболявания със сходна симптоматика на тази на ботулизма, които биха могли да доведат до поставяне на грешна диагноза в клиничната практика

| | |
|--|--|
| Синдром на Гилен-Баре | Автоимунно възпалително заболяване, засягащо периферната нервна система, проявяващо се с вяла парализа , вегетативни разстройства и нарушения във възприятията. |
| Миастения гравис | Хронично автоимунно заболяване, характеризиращо се с мускулна слабост и лесна уморяемост след физическа активност. Причината е нарушено нервно-мускулно предаване в напречноабраздената (скелетната) мускулатура. |
| Инсулт | Кислородна недостатъчност, вследствие на запушване в кръвотока или кръвоизлив и смърт на мозъчни клетки. Симптомите са замайване (виене на свят), затруднено вървене, загуба на равновесие, координация и способността за контрол на движението, слабост и парализа на лицевата мускулатура, ръка, крак, обикновено от едната половина на тялото. |
| Чревни инфекции - Salmonella, E. coli | Бактериални инфекции, които причиняват патология в стомашно-чревен тракт. Симптоматиката се изразява в ентеритен синдром - гадене, повръщане, диария, тежест и болка в коремната област, обложен език. В някои случаи – тахикардия, артериална хипотония, палпаторна коремна болка. |
| Тетанус | Остро инфекциозно заболяване, което протича с повишен мускулен тонус, тонични гърчове, десцендентно прогресираща парализа и други. |

2.2.2. Епидемиологична характеристика

По данни на CDC за последните 50 години *коэффициентът на смъртни случаи* след отравяне с ботулинов невротоксин е *намалял с около 60% – от 75% на 15,5%* (CDC, 2007).

България, НЦОЗА

- Докладвани причини за заболяемостта от ботулизъм (2007–2016) са следните:
- консумация на домашно приготвени *компоти* (2 случая, инфекциозно огнище в рамките на семейството)
- консумацията на *консервирана храна*, приготвена при домашни условия и необработена термично след отварянето ѝ (2 случая, инфекциозно огнище в рамките на семейството)
- консумация на домашни *консерви от свинско месо* (2 случая, инфекциозно огнище в рамките на семейството)
- консумация на *консервирано месо* (1 случай).
- Няма регистрирани починали от ботулизъм през разглеждания период.

Таб. 2. Обобщение на докладваните случаи на ботулизъм по категории и статус – България, 2007 – 2016 година (НЦОЗА, доклади от 2008 до 2017)

| | Брой случаи | Смъртни случаи | Заболяваемост (на 100 000 д.) | Възр. групи (брой случаи) | Инф. огнища | Област |
|-------------|-------------|----------------|-------------------------------|-------------------------------------|-------------|--|
| 2007 | 1 | 0 | 0.01 | 50-54 | 0 | Русе |
| 2008 | 0 | 0 | 0 | - | 0 | - |
| 2009 | 2 | 0 | 0.03 | > 65 (2) | 0 | Видин (1) Разград (1) |
| 2010 | 1 | 0 | 0.01 | 60-64 (1) | 0 | Враца |
| 2011 | 3 | 0 | 0.04 | 50-54 (1) 60-64 (1) > 65 (1) | 1* | Варна (2) София гр. (1) |
| 2012 | 3 | 0 | 0.04 | 30-34 (2) 45-49 (1) | 0 | Шумен (1) Монтана (1) Силистра (1) |
| 2013 | 1 | 0 | 0.01 | 30-34 (1) | 0 | Монтана (1) |
| 2014 | 3 | 0 | 0.04 | 15-19 (1) 20-24 (1) 60-64 (1) | 1* | Шумен (2) Варна (1) |
| 2015 | 3 | 0 | 0.04 | 30-34 (1) 50-54 (1) 55-59 (1) | 1* | София гр. (1) Търговище (2) |
| 2016 | 3 | 0 | 0.04 | 55-59 (3) | 0 | Монтана (2) Русе (1) |

*Бележки: * инфекциозно огнище в рамките на семейството*

Европа, ECDC

По последни оповестени данни от Европейския център за превенция и контрол на заболяванията (ECDC) през **2014 година са докладвани 123 случая** (от тях са потвърдени 91 случая) от общо **16 държави от ЕС**. Нивото на нотификация за ЕС е **0.02 случая на 100 000 души от населението**.

Табл. 3. Докладвани случаи на ботулизъм по категории и статус – Европа, 2014 година (ECDC, 2015)

| Брой случаи | Средна възраст (обхват) | Пол (съотношение) | Възрастови групи (най- засегнати) | | Инфекциозни огнища |
|-------------------------------|-------------------------------|----------------------|--------------------------------------|---------------------------------|-----------------------|
| 123 (91 потвърдени) | 2.7 мес. (0-10 мес.) | 1.9 мъже:1 жени | мъже: 0-4 год. 45-65 год. | жени: 0-4 год. 25-44 год. | 1 |

- **В Румъния са докладвани 31 потвърдени случая, в Полша – 17, и в Унгария – 12.** В тези държави са отчетени най-голям брой потвърдени случаи.
- Дванадесет страни съобщават между **1–6 потвърдени случая**.
- **Отчетено е едно инфекциозно огнище на ботулизъм сред употребяващи инжекционни наркотици в Норвегия с начало през декември 2014 година.** До февруари 2015 година са съобщени **23 случая на ботулизъм**. За източника на инфекцията се приема **заразен хероин** (ECDC, 2015)

САЩ, CDC

По последни оповестени данни на Центъра за контрол на заболяванията (CDC), САЩ:

- През 2015 година са регистрирани **199 потвърдени и 14 вероятни случая на ботулизъм**:
- Сред потвърдените случаи **детски ботулизъм** е диагностициран при **141 (71%)** случая;
- **Хранителен ботулизъм** – **39 (20%)** случая;
- **Раневи ботулизъм** – **15 (8%)** случая и ботулизъм с неизвестен произход или друга категория – **4 (2%)** случая.
- **Смъртните случаи** за отчетния период са **3**.
- Докладваните причини за заболяемостта от ботулизъм и възникването на инфекциозни огнища през отчетния период са следните: консумация на домашно **консервирани картофи** (27 случая, 1 инфекциозно огнище); **ферментирали тюленови перки** (4 случая, 1 инфекциозно огнище); **цвекло, печено в алуминиево фолио** и съхранявано при стайна температура в продължение на няколко дни, след това добавено в супа (2 случая, 1 инфекциозно огнище).
- При случаите на потвърден **раневи ботулизъм** (15 случая) четиринадесет (**93%**) са били **пациенти**, които приемат **инжекционни наркотици**.

САЩ, CDC

Табл. 4. Докладваните случаи на ботулизъм по категории и статус - САЩ, 2015 година (CDC, 2016)

| Форма на ботулизъм | Брой случаи | Средна възраст (обхват) | Смъртни случаи | Пол | Тип на токсина | Инф. огнища* |
|-----------------------|-------------|-------------------------|----------------|---------------------------------|---|--------------|
| При кърмачета | 141 | 2.7 мес. (0-10 мес.) | 0 | 71 (50%) мъже, 70 (50%) жени | 60 (43%) А, 79 (56%) В, 2 (1%) Vf | 0 |
| Хранителен, потвърден | 39 | 64 г (9 – 92 г) | 1 | 14 (36%) мъже, 25 (64%) жени | 34 (87%) А, 5 (13%) Е | 5 |
| Хранителен, вероятен | 6 | 53 г (23 – 73 г) | 0 | 3 (50%) мъже, 3 (50%) жени | - | 1 |
| Раневи, потвърден | 15 | 49 г (12 – 61 г) | 1 | 13 (87%) мъже, 2 (13%) жени | 14 (93%) А, 1 (7%) В | 0 |
| Раневи, вероятен | 8 | 59 г (28 – 78 г) | 0 | 7 (88%) мъже, 1 (12%) жени | - | 0 |
| Неопределен /друг | 4 | 47 г (27 – 91 г) | 1 | 3 (75%) мъже, 1 (25%) жени | 4 (100%) А | 0 |

Бележки: * Огнища, дефинирани като два или повече случаи, произтичащи от обща експозиция.

§ Вероятен хранителен ботулизъм се определя като клинично съвместим случай с епидемиологична връзка (например консумация на домашно консервирана храна през предходните 48 часа).

Вероятен раневи ботулизъм се определя като клинично съвместим случай, при който няма подозрение за консумация на заразена храна и при който има анамнеза за 2 седмици преди началото на заболяването, свързано с наличие на прясна рана или на инжектиране на наркотици.

2.2.3. Форми на ботулизъм

Основни форми на заболяването са:

1. **Хранителен ботулизъм** - най-често срещаната и първата диагностицирана форма на заболяването. Причинява се предимно от ботулинов токсин тип А, В и Е. Минималното количество невротоксин в хранителен продукт, способно да предизвика заболяване при консумация е **50 нанограма**.

2. **Раневи ботулизъм** - за първи път е диагностициран през 1951 година (*Davis et. al., 1951*), причинен от тъканна локална инфекция. Първоначално, раневия ботулизъм се характеризира със заразяване на рани единствено по крайниците. През 80те години на ХХ век се диагностицира раневи ботулизъм при 15-годишно момиче, което се оплаква от диплопия 5 дни след раждане чрез цезарово сечение. Това е първият нозокомиален случай на раневи ботулизъм и първият пациент, чиято рана не е в крайна точка. Най-чести изолати са типове А и В.

3. **Ботулизъм при кърмачета** - докладван е за първи път през 1976 година, причинен от чревна колонизация от *C. botulinum* с последващо *in vivo* производство на токсини. В САЩ тази форма на ботулизъм се среща по-често от хранителния ботулизъм (*Jawetz et. al., 2013*). Най-чести изолати са типове А и В.



Табл. 5. Хранителни продукти, от които се изолира *Clostridium botulinum*

| Хранителен продукт | Токсин (тип) | Локализация | Публикация |
|------------------------------|--------------|----------------|----------------------------------|
| консервирани зеленчуци | A | Европа, | Chin J, 2000 |
| | B | Тайланд | Wangroongsarb, 2014 |
| консервирани плодове | A | България | НЦОЗА, 2016 |
| | B | САЩ | Chin J, 2000 |
| консервирани бобови култури | A | Германия | Landmann, 1904 Momose, 2014 |
| | | Япония | Amettler, 2017 |
| консервирано месо | B | Европа | Chin J, 2000 |
| | A | България | НЦОЗА, 2010; НЦОЗА, 2012 |
| пушени меса и колбаси, шунка | A | Европа | Chin J, 2000; Hospital, 2016 |
| | B | Франция | Feng, 2015; Mazuet, 2015 |
| морски дарове | A, E | Япония | Chin J, 2000 |
| пушена съомга | A, B | Канада | Chin J, 2000 |
| | E | Аляска | Ball, 1979 |
| хайвер | - | Канада, Аляска | Chin J, 2000 |
| тюленово месо | E | Канада | Chin J, 2000 |
| китово месо | A | Аляска | Horowitz, 2015 |
| месо от бобър | | САЩ | CDC, 2016 |
| | | Квебек | Leclair, 2017 |
| картофи, картофена салата | A | САЩ | Seals et. al., 1981; Doods, 1990 |
| | | | McCarty et. al., 2015; CDC, 2016 |
| цвекло | A | САЩ | CDC, 2016 |
| чесън | B | Канада, САЩ | HWC, 1986; WHO, 2002 |
| лук | - | | WHO, 2002 |
| царевица | A, B | | WHO, 2002 |
| маслини | - | | WHO, 2002 |
| гъби | A | Ванкувър | HWC, 1987 |
| песто, сосове | B | | Doods, 1990 |
| мед | A, B | Англия | Desurkar, 2015 |
| бамбукови кълнове | B | Тайланд | Swaddiwudhipong, 2000; CDC, 2006 |

Раневи ботулизъм

- През последните години се наблюдават тревожни промени, докладвани в разработки от различни части на света: драматично **нарастване броя на случаите** на раневи ботулизъм и промяна на видовете рани от нежелана груба травма до **самоинжектиране на лекарства и наркотични вещества** от пациенти със зависимости.
- Употребата на **мексиканския хероин „черен катран“** е отговорен за множество случаи на раневи ботулизъм в Калифорния (*Anderson et. al., 1997; Maselli et. al., 1997*) и други части на света (*Werner et. al., 2000*). Този вид раневи ботулизъм все по-често е наричан **„shooter’s botulism“** (**ботулизъм на стрелеца**).
- Важен белег за разграничаване на хранителния и раневия ботулизъм е **продължителността на токсичното производство**. При хранителната форма, **експозицията е ограничена до количеството на погълнатия токсин**, докато в раневия ботулизъм, токсинът може да продължи да се **произвежда в травмираната тъкан** до отстраняване на инфекцията.
- Степента на смъртност - 15% (WHO, 2012).

Кърмачески ботулизъм

Патогенезата на кърмаческия ботулизъм се *различава от тази на хранителния*. При хранителния ботулизъм, не се проследява производство на токсини в червата, *степента на интоксикацията е пропорционално на количеството погълнат токсин* в хранителен продукт, където той преди поглъщането се е образувал и натрупал. При кърмаческия ботулизъм, след поглъщането на патогена, *спорите вегетират и продуцират токсина in vivo в дебелото черво*. Причините за по-високата податливост на кърмачетата към чревна колонизация с клостридии, е *недостатъчно ниската киселинност на стомашния сок* в тази възраст (до 1 година) и „*бедният*“ *състав на нормална чревна микрофлора*, която осъществява два защитни механизма от клостридийната инфекция:

- подтиска развитието на патогенна, чрез *секрецията на бактерицини* и други;
- *блокира рецептори на чревния епител*, към които клостридиите адхезират.

Смъртността при хоспитализираните случаи в САЩ е по-малко от 1%.

Табл. 6. Патогенетични различия в токсичната продукция между трите основни форми на ботулизъм

| | |
|-------------------------|---|
| Хранителен ботулизъм | Степента на интоксикация е пропорционална на количеството продуциран и натрупан токсин в консумирания хранителен продукт. Не се проследява производство на токсини в червата. |
| Раневи ботулизъм | Токсината продукция продължава в травмираната тъкан до отстраняване на инфекцията. |
| Ботулизъм при кърмачета | След поглъщането на контаминиран хранителен продукт, спорите на патогена вегетират и продуцират токсина <i>in vivo</i> в дебелото черво. |

Днес се срещат и други форми на ботулизъм, като:

4. **Ятрогенна (причинена от лекаря)** – настъпва в следствие на прекомерна **терапевтична употреба** на препарати, съдържащи ботулинов невротоксин. **Това са пациенти, чиято история на заболяването включва скорошен инжекционен прием на ботулинов токсин, особено приложен на големи мускулите, с цел системен ефект.**

5. Ботулизъм, предизвикан от умишлено заразени продукти, с цел **биотероризъм**. Ботулиновият невротоксин влиза в **арсенала на биологичното оръжие**.

6. **Инфекциозен ботулизъм при възрастни** – резултат от колонизация на червата с *C. botulinum* и **in vivo производство на токсини** по начин, подобен на ботулизма при кърмачета. Тези пациенти често имат анамнеза за коремна хирургия, болест на Крон или скорошно антибиотично лечение (дисбактериоза).

7. **Водният ботулизъм** - би могъл теоретично да се предизвика от поглъщането на предварително образувания се **ботулинов токсин във вода**.



Фиг. 32.

2.2.4. Лабораторна диагностика

• **Хранителен ботулизъм** – токсинът може да бъде доказан в серума, стомашни секрети, фецес или остатъци от храна (WHO, 2002). По данни на *Chin J (2000)*, ботулиновият токсин **рядко се открива в серумни проби на пациенти с хранителен ботулизъм**. При тази форма на ботулизъм, фекалните проби съдържат голямо количество *C. botulinum* и ботулинов токсин (**приблизително 10^6 микроорганизми** на грам проба), но обикновено **токсина и патогена се изхвърлят за кратък период**. Изолиране на *C. botulinum*, **без доказване на токсична продукция в подозираната храна, нямат диагностична стойност** (WHO, 2002). Причината е повсеместното разпространение на ботулиновите спори.

• **Ранев ботулизъм** – най-надеждният диагностичен образец при раневия ботулизъм е серум (15 мл), за който е установено, че е **положителен за токсичност в 93% от случаите на ботулизъм**. Резултатите от получените посявки са положителни в **65% от изследваните пациенти с ботулизъм**. Доказан е също така свободен токсин директно от абсцесната тъкан (*Werner et. al., 2000*).

• При случаи на **ботулизъм при кърмачета**, *C. botulinum* и токсинът могат да се докажат в **чревна съдържимо, но не и в серум** (патогенезата се различава от тази, проследявана при възрастните индивиди). При тази форма на ботулизъм е важно да се има предвид **продължителното носителство на *C. botulinum* във фецеса**, което изисква по-продължителна лабораторна диагностика.

2.2.4. Лабораторна диагностика

- *Natheway C (1995)* описва два клинични случая на **инфекциозен ботулизъм при възрастни**, при които ботулинов токсин тип А се доказва във фецес до 119 и 130 дни след появата на болестта. Патогенезата на тази форма на ботулизъм е сходна с тази при кърмаческия, т.е. **продължителното носителство на патогена е обща характеристика**, носеща и потенциален **риск от появата на инфекциозни огнища в семейната среда**.
- Автоматизирани системи за детекция на токсина, включват **тестовете ELISA и полимеразна верижна реакция (PCR)**. Чрез количествен PCR лесно могат да се докажат **гените кодиращи типовете токсин А, В, Е и F**, но недостатък на анализа е, че може да се позитивира от микроорганизми, които носят съответния ген, но **не демонстрират експресия на токсин**.
- **Електромиография** с бърза повтаряща се стимулация, може да бъде полезна за потвърждаване на клиничната диагноза при всички форми на ботулизъм.

2.2.5. Превенция

- Основните мерки, с цел превенция на ботулинови инфекции се изразяват в ***адекватна термична обработка на хранителните продукти***, с особено внимание при консервираните храни.
- За унищожаване на спорите е необходимо повече от ***20 минути термична обработка преди консумация***. Строгата регулация на търговското консервиране е насочена главно към преодоляване на опасността от настъпване на епидемии.
- ***Хлорът и неговите комплексни съединения са сред най-ефективните химикали за унищожаване на спорите (Johnson, 2013)***. Комерсиалното приготвените храни, обаче, могат да съдържат жизнени патогени.
- Хранителните продукти, съдържащи токсини може да са развалени и гранясали, а ***металния капак на консервите да "набъбне"***, но в много случаи е възможно външния вид да не подсказва контаминация.
- Необходимо е, също така, ***да се избягва консумацията на мед от деца на възраст под 1 година***.

2.2.5. Терапия

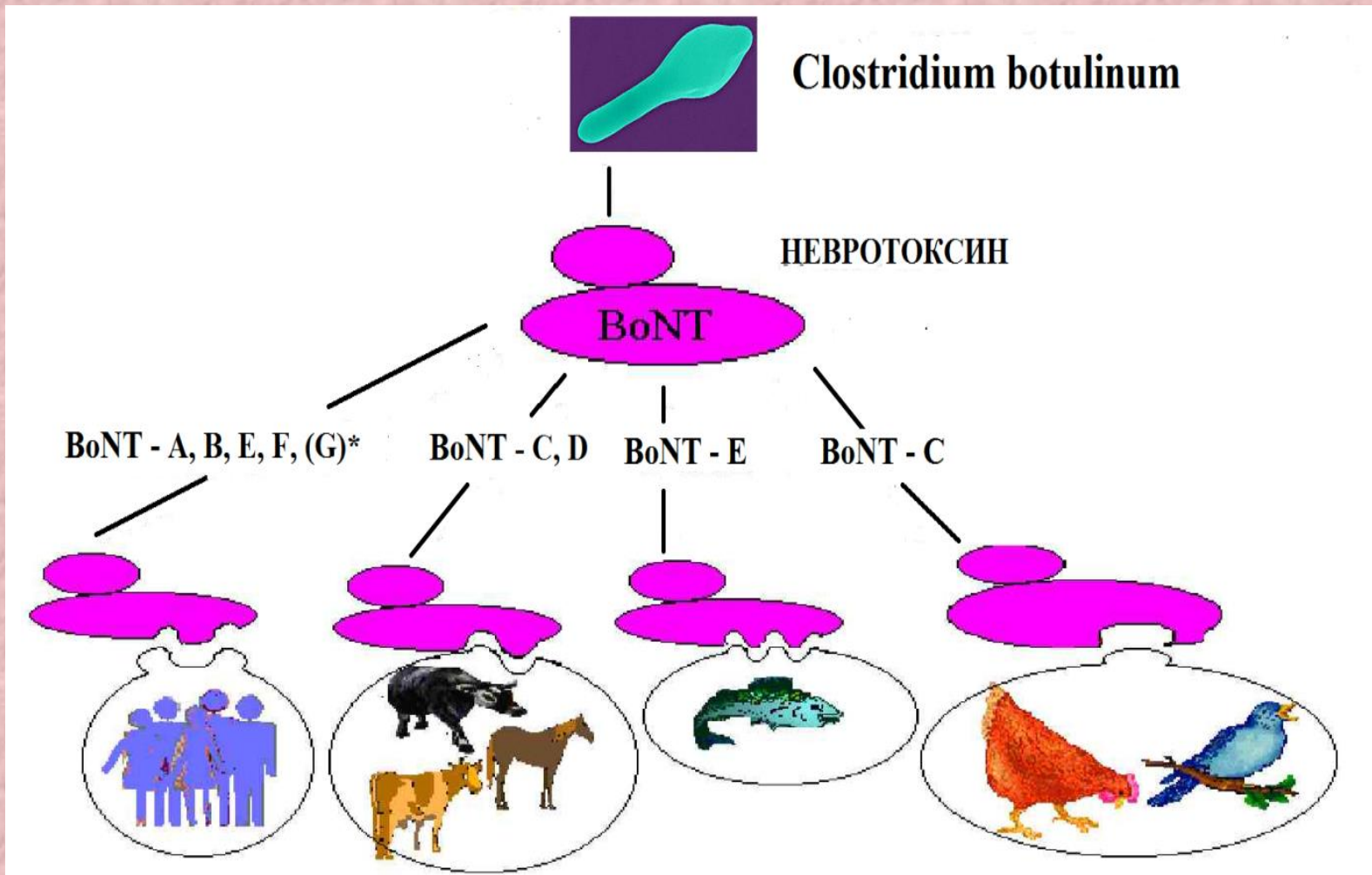
- Незабавно прилагане на мощни *имунни серуми*.
- Най-често се прилага *тривалентен (типове А, В и Е) антитоксин*. Т.е. имунните серуми, *често не съдържат серотип F*, поради което случаите на ботулизъм, дължащи се на токсин тип F, предизвикват безпокойство (*Castor, 2015; ECDC, 2015a*).
- Всеки флакон съдържа *нива на антитоксин > 100 пъти, необходими за неутрализиране* на най-голямото количество циркулиращ токсин, което някога е било измерено в Центровете за контрол и превенция на заболяванията (CDC). Съответно CDC препоръчва да се използва само 1 флакон антитоксин.
- *Механична вентилация*.
- Тези мерки *намаляват процента на смъртност от 65% до под 15-25%*.
- Раневия ботулизъм включва и *третиране, включително и хирургично, на травмираните тъкани*, инвазирани с *C. botulinum*.
- *Пеницилин, тетрациклин, метронидазол и хлорамфеникол*.
- *Аминогликозидите трябва да се избягват*, тъй като те могат да предизвикат *невромускулна блокада*.

3. Ботулинов невротоксин

3.1. Серотипове

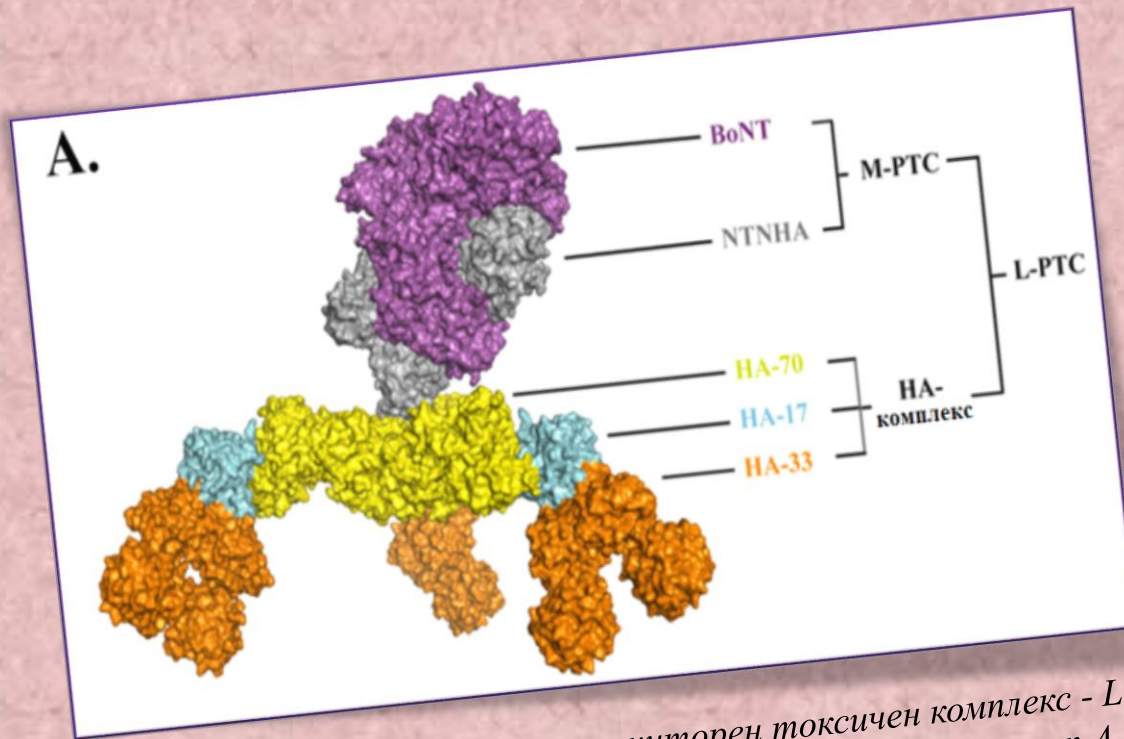
- *Clostridium botulinum* е основен биопродуцент на ботулиновия невротоксин, при видовете *C. butyricum* и *C. baratii* също е доказана продукцията, съответно на типовете Е и F.
- Познати са **девет серотипа** на токсина, наименовани с латинските букви от А-Н (Фиг. 33). Серотип С е разделен на два типа – С1 и С2, серотип Н е **новооткрит** (Barash et. al., 2013).
- По данни Kull et. al. (2015) в Германия е характеризиран и **нов подтип** на невротоксина, подтип А8.
- **Серотипин А на токсина се отличава като най-мощен**, следван от типовете В и F. Типове А, В и Е са най-честите причинители на ботулизъм при човека (Nigam et. al., 2010), F и G се изолират рядко.
- **Тип Е има ограничено географско разпределение** и се среща предимно в северните страни като Канада, Финландия, Япония, Норвегия, Швеция, Русия и Аляска в Съединените щати (Macdonald, 2011; Wangroongsarb, 2014).
- Невротоксин тип С се изолира предимно от **птици**.
- Тип D причинява ботулизъм при **бозайници**.

3.1. Серотипове



Фиг. 33. Серотипове А, В, Е и F (данните за G са спорни) причиняват ботулизъм при човека, серотипове С и D – при селскостопански и диви животни, Е - при риби

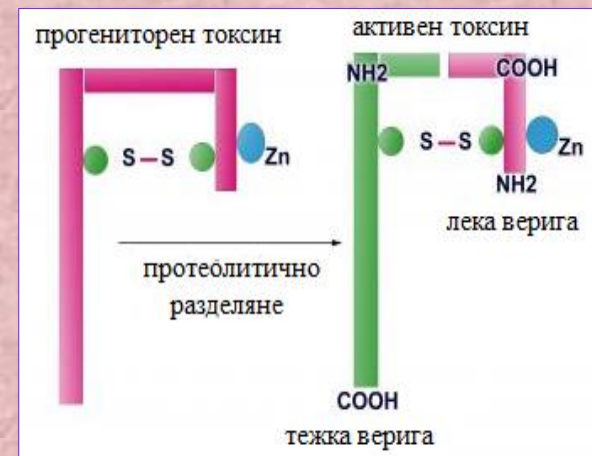
3.2. Структура



Фиг. 34. Структура на голям прогениторен токсичен комплекс - L-PTC (Large - progenitor toxin complex) на ботулинов токсин тип А.

Общата молекулна маса на невротоксичния компонент е **150 kDa**. В комплекс с веригата са свързани и редица други нетоксични протеини - NAPs (*non-toxic neurotoxin-associated proteins*), по този начин BoNT и NAPs заедно формират т.нар. **голям прогениторен токсичен комплекс – L-PTC** (Large-progenitor toxin complex)

BoNT е невротоксичен протеин, чиято полипептидна верига се състои от **лека верига** (≈ 50 kDa), свързана с молекула Zn^{2+} в N-края си и **тежка верига** (≈ 100 kDa). Между двете вериги има **дисулфидна връзка**.



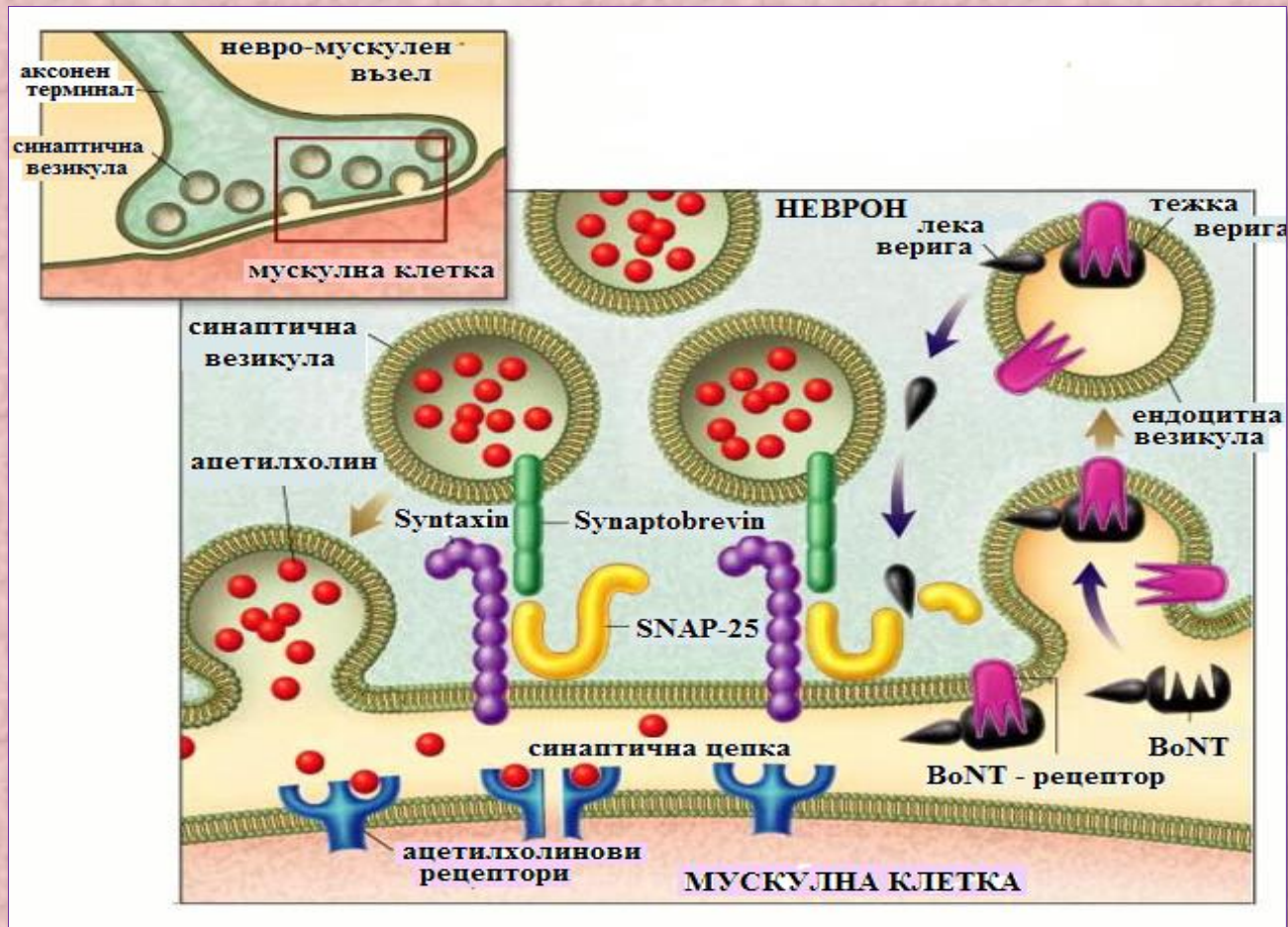
Фиг. 35. Структура на ботулинов невротоксин (схематична диаграма)

3.3. Механизъм на действие

В осъществяване на мускулното съкрящение основна роля играе **ацетилхолинът**, който представлява **невротрансмитер** в невромускулната връзка. В норма, съкрящението на мускула се осъществява след като импулсът се предвижи в нервната клетка до нейния край, с помощта на ацетилхолин. От там, последният преминава в междуклетъчното пространство, достига **ацетилхолиновите рецептори на мускулната клетка** и чрез предадения импулс мускулът се съкрява.

Попадайки в среда с **неутрално рН**, молекулата на ботулиновия невротоксин се разделя на лека и тежка верига и преминава в **активна форма**. Тежката (Н) верига на токсина се свързва необратимо и избирателно с рецептори на пресинаптичната повърхност на холинергичните неврони, и комплекса токсин-рецептор предизвиква ендоцитоза. Дисулфидната връзка между двете вериги се разкъсва и **токсина се освобождава в цитоплазмата**. Леката (L) верига взаимодейства с т. нар. **„разцепващите протеини” (SNAREs)**, включващи *SNAP 25* и *Synaptobrevin* (познат още като везикулно-свързан мембранен протеин 2 – VAMP 2) протеините. L-веригата на невротоксини тип А, C₁, Е взаимодействат със *SNAP 25*, а тези на невротоксини тип В, D, F и G - със *Synaptobrevin*. Свързването се осъществява в нервните окончания и води до разрушаване на SNAREs, като по този начин се предотвратява освобождаването на ацетилхолиновите везикули от клетъчната мембрана. В резултат, предаването на нервния импулс се блокира и мускулите се парализират (*Фиг. 34*).

3.3. Механизъм на действие



Фиг. 5. Механизмът на действие на BoNT (вдясно), сравнен с предаван нервен импулс в норма (вляво)

Ботулиновият невротоксин предотвратява освобождаването на ацетилхолиновите везикули от клетъчната мембрана на неврона. В резултат, предаването на нервния импулс се блокира и мускула косвено се парализира.

Таблица 7. Различните серотипове (A-G) на *Clostridium botulinum*, тяхната субстратна специфичност и специфичното „място на разцепване” в субстратната молекула

| Серотип | SNARE протеин (субстрат) | Място на разцепване |
|----------------|-------------------------------------|--|
| A | SNAP-25 | Gln ¹⁹⁷ -Arg ¹⁹⁸ |
| B | Synaptobrevin | Gln ⁷⁶ -Phe ⁷⁷ |
| C ₁ | SNAP-25 Syntaxin | Arg ¹⁹⁸ -Ala ¹⁹⁹ Lys ²⁵³ -Ala ²⁵⁴ |
| D | Synaptobrevin | Lys ⁵⁹ -Leu ⁶⁰ |
| E | SNAP-25 | Arg ¹⁸⁰ - Ile ¹⁸¹ |
| F | Synaptobrevin | Gln ⁵⁸ -Lys ⁵⁹ |
| G | Synaptobrevin | Ala ⁸¹ -Ala ⁸² |

3.3. Механизъм на действие

- Пикът на парализиращия ефект настъпва след *два до седем дни от началото на процеса*.
- Парализата е *обратима и временна* – постепенно нервът се възстановява. Засегнатите нервни терминали, обаче, не се възстановяват. Функциите се нормализират чрез *формиране на нови нервни окончания и синаптични контакти*, което обикновено отнема *два до три месеца*.

Разрушаване на “разцепващите протеини” и потискане на болката

Вещество Р е невропептид, който участва в *генезиса на болката*. Подобно на ацетилхолина, вещество Р се освобождава чрез процес, *изискващ наличието на „разцепващите протеини” (SNAREs)*. При описания по-горе механизъм, *ботулиновия токсин разрушава SNAREs-протеините, блокира процесите свързани с действието на Р субстанцията и облекчава болковите смущения (Coats et. al., 2007)*. Поради големия си размер ботулиновият токсин не е в състояние да премине кръвно-мозъчната бариера и директни ефекти на невротоксина върху централната нервна система не се наблюдават.

***Глава 3. Приложение на ботулинов невротоксин
в клиничната практика.***

- Способността на ботулиновия невротоксин да **блокира освобождаването на невротрансмитера ацетилхолин** и косвено да предизвика мускулна парализа, е животозастрашаваща.
- В същото време, обаче, тази способност се оказва изключително ефективна при **терапия на редица заболявания**, свързани с абнормна хиперактивност на мускули и жлези, като инконтиненция, дистония, включително блефароспазъм, тремор, тазови нарушения, преждевременна еякулация.
- Голям брой публикации демонстрират ефективността на невротоксина при заболявания като детска церебрална парализа, мигрена, болкови синдроми, стомашно-чревни нарушения, болест на Паркинсон и други.
- Теоретично, всяко разстройство, причинено от **прекомерно освобождаване на невротрансмитери с последваща неволна патофизиологична активност**, може да бъде лекувано с ботулинов токсин.

3.1.Терапевтични индикации

Основен принос на монографичния труд

В 37 страници (65-102 стр.) от монографичния труд са представени **33 заболявания**, при които ботулиновият невротоксин **демонстрира доказан терапевтичен ефект** и има различна степен на приложение в клиничната практика.

Изработени са **9 метаанализа**, които представят закономерности от **82 научни изследвания** с приложение на серотипове от токсина за терапия и овладяване на симптоматика при заболявания от различни клинични направления: **офтальмология, неврология, урология, гинекология, гастроентерология, дерматология и в областта на денталната медицина.**

В всеки метаанализ са проследени следните **аспекти от терапевтичното приложение** на токсина в клиничното проучване:

- **брой пациенти** (изследвани лица);
- **вид на проучването** – отворено, двойно сляпо
- **ефективност на терапията** (% пациенти)
- приложен **серотип на токсина**
- приложена **терапевтична доза**
- **мускул, мускулна група на приложение**
- продължителност на **терапевтичното действие**
- документирани **странични ефекти**
- **година** на провеждане на проучването

Табл 8. Терапевтични индикации на ботулинов невротоксин

Офталмологични заболявания

Страбизъм

Намалено слъзообразуване, синдром „сухо око”

Синдром на крокодилските сълзи

Защитна птоза

Неврологични заболявания

Блефароспазъм

Цервикална дистония (спастичен тортиколис)

Хемифациален спазъм

Крампи на писателя

Спастичност

Синдром на Турет

Спазмодична дистония

Оромандибуларна дистония

Дистония на краката

Аксиална дистония

Хронична мигрена

Хронична болка

Урологични заболявания

Неврогенна детрузорна свръхактивност

Идиопатична детрузорна свръхактивност

Доброкачествена простатна хиперплазия

Детрузорно-сфинктерна дисинергия

Гинекологични заболявания

Вагинизъм

Генитален болков синдром

Заболявания на гастроинтестиналния тракт

Ахалазия

Дифузен езофагиален спазъм

Увеличен тонуса на долния езофагеален сфинктер

Хиперконтрактилен хранопровод,

„хранопровод-лешникотрошачка“

Абнормни контракции на пилора

Гастропареза

Хронична анална фисура

Спазъм на *сфинктера на Одди*

Анимизъм

Спастичността на аналния сфинктер

Отоларингология

Спазмодична дисфония

Сиалорея

Ринит

Стоматологични заболявания

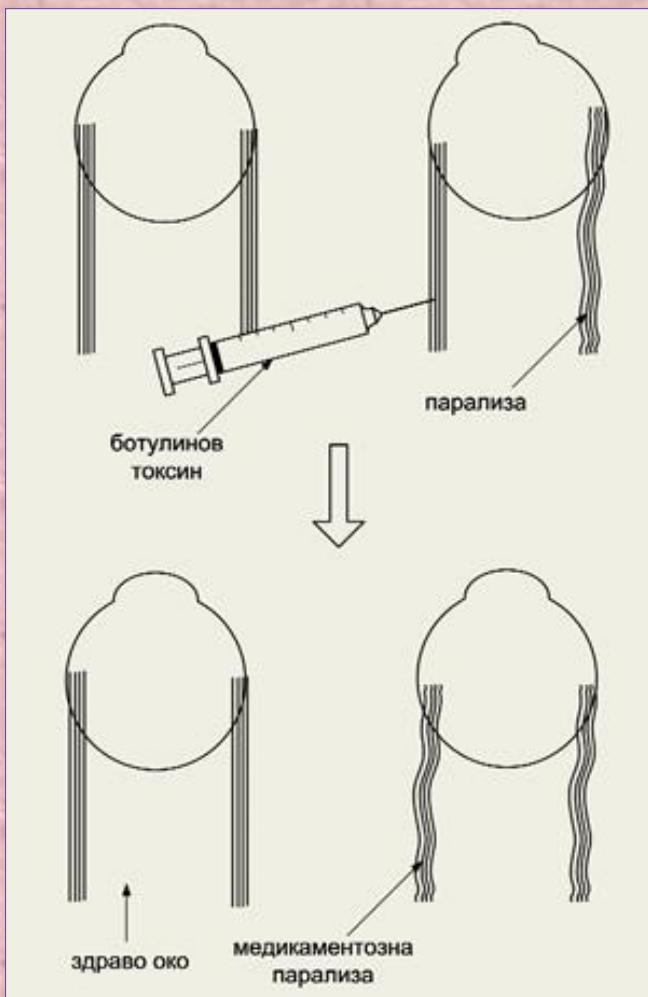
Бруксизъм

Дерматологични заболявания и корекции

Хиперхидроза

Корекция на бръчки

3.1.1. Страбизъм (кривогледство)

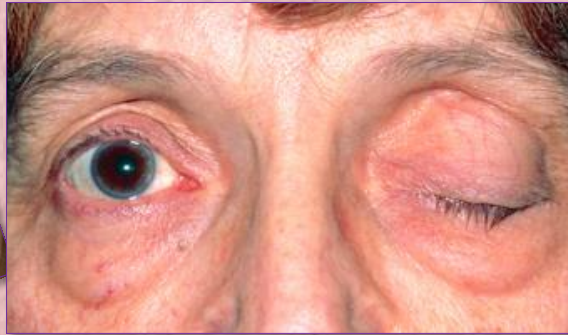


При поява на парализа на външен очен мускул се нарушава *баланса между него и съответния му антагонист* (мускулът от другата страна на същото око), което отклонява окото в посока към по-силно действащия антагонист с *поява на двойни образи*. В последствие може да се добави и механичен фактор – контракция на антагониста, което да попречи на мускулния баланс.

Инжектирането на ботулинов невротоксин в антагонист на парализиран очен мускул води до *поява на временна парализа и възстановяване на мускулния баланс*. След преминаване на придобитата и индуцирана мускулна парализа се постига *нормална подвижност на окото*.

3.1.2. Фокална дистония

Дистониите са неврологични нарушения на движението, засягащи различни части на тялото и причиняващи **неволеви мускулни съкращения**. Фокалната дистония засяга една част на тялото – клепачи (блефароспазъм), шия и рамене (цервикална дистония), уста и др.



Приложението на невротоксина при пациенти с дистония има широко приложение и повлиява с висока ефективност симптоматиката чрез **релаксиране на мускулатурата**. Проучвания показват, че ВоNT-препарати намалява не само аномалните движения и контракции, но и **предотвратяват вторични дегенеративни промени**.

3.1.3. Инконтиненция, вследствие патология в пикочния мехур

Уринарната инконтиненция представлява **неволното изпускане на урина**. Причини за появата ѝ може да са стрес, свръхактивен пикочен мехур, препълване на мехура, в случаи на деменция, нарушено съзнание и други.

Токсинът се **инжектира в стената на пикочния мехур**, за да намали дейността на нервите, които причиняват симптомите. Терапията повлиява **честотата на позивите и императивната инконтиненция**.



3.1.4. Хронична болка

Ботулиновият невротоксин повлиява **тензионно главоболие, мигрена и хронично тензионно главоболие**. Използва се и като влияещ върху нервната система агент в процедури за намаляване и на други видове болезненост – при **дъвкателна миалгия, хронични болки във врата, тригеминална невралгия**.

Изследване на Hsieh L et al. (2016) с 46 пациента в Тайван показва, че терапията с BoNT-A облекчава болката при пациенти с **остеоартрит на коляното**.

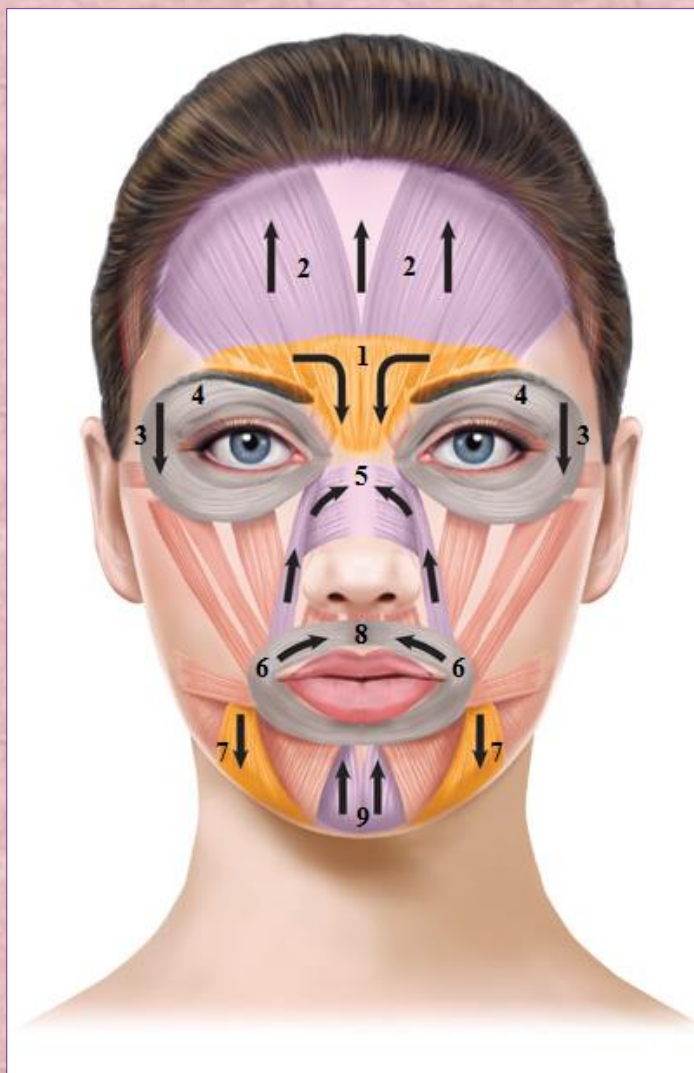


3.1.5. Хиперхидроза



*Хиперхидрозата (така нареченото профузно потене) се изразява в прекомерно изпотяване, което най-често засяга аксилите, дланите, стъпалата и лицето. Заболяването се дължи на анормална активност на потните жлези. BoNT-терапия е много ефективна неинвазивна процедура в това направление. **От три до седем дни** след приложението на ботулиновия невротокси изпотяването се преустановява за **средно четири месеца**.*

3.1.6. Приложение на токсина за козметични цели



Фиг. 9. Функционална анатомия на лицето (Small, 2012; Small, 2014)

| Мимически бръчки | Мускул | Действие |
|--|------------------------------------|---|
| Бръчки на намръщването | Corrugator supercilii | Отпуска веждите медиално |
| | Procerus and depressor supercilii | Отпуска веждата |
| Хоризонтални челни бръчки | Frontalis | Повдига веждата |
| Бръчки тип „Crow’s feet” (пачи крак) | Lateral orbicularis oculi | Отпуска веждите латерално |
| Бръчки около веждите | Superior lateral orbicularis oculi | Отпуска веждите отгоре и латерално |
| Бръчки тип „Bunny lines” (заешка муцунка) | Nasalis | Движи носа, включително и медиално |
| Радиални бръчки около устата | Orbicularis oris | Набръква устните |
| Марионетни бръчки | Depressor anguli oris | Отпуска ъгълчетата на устата |
| „Gummy smile” и назолабиални бръчки | Levator labii superioris alaeque | Повдига централно устните |
| Бръчки на брадичката и „камениста брадичка” | Mentalis | Изгражда брадичката и я повдига в по-ниската ѝ част |
| Легенда: оранжево – отпускащ мускул; лилаво – повдигащ мускул; сиво – свиващ мускул. | | |

3.2. Пречистена форма

По-голямата част от използваните в момента клинични препарати, съдържащи ботулинов токсин, *съдържат и протеините от целия токсичен комплекс*. Те включват нетоксичен, нехемаглутиниращ протеин (NTNH) и хемаглутиниращи протеини (НА) - с няколко хетероложни субединици. Формирания комплекс може да бъде до **900 000 Da (ботулинов токсин тип А)**. Клинични изследвания предоставят данни за получаването на различни серотипове ботулинов невротоксин, *пречистени до над 95%*. Това показва, че получаването на високо пречистени невротоксични състави за клинична употреба е реалистична цел. Те предлагат редица потенциални предимства пред продуктите, които съдържат NTNH и НА. При тях се *избягва протеиновото натоварване в организма* на пациента и същевременно се подобрява възпроизводството на токсина във фармацевтичните продукти.



3.3. Клинични препарати

На световния пазар съществува разнообразие от продукти, съдържащи ботулинов токсин за терапевтично приложение, които са получили одобрение от регулаторните органи или са в процес на разработка.

- Към момента *Botox*[®] дава дял от 85% от световния пазар на продукти, съдържащи ботулинов невротоксин и по-голямата част от научните рецензирани статии, свързани с токсина.
- Други широко използвани препарати са *Dysport*[®] (ботулинов токсин тип А), *Xeomin*[®] съдържа ботулинов токсин тип А и спецификата при него е, че е лишен от всички комплексни протеини.
- *Myobloc*[®] / *NeuroBloc*[®] (единственият наличен продукт, съдържащ ботулинов токсин тип В) и други.

| Таблица 10. Сравнителна характеристика на лекарствени препарати, съдържащи ботулинов невротоксин | | | | |
|---|---|--|---|---|
| A. | Onabotulinum-toxin A | Abobotulinum-toxin A | Incobotulinum-toxin A | Rimabotulinum-toxin B |
| Комерсиални имена | Botox [®] , Botox Cosmetic [®] , Vistabel [®] , Vistabex [®] | Dysport [®] , Reloxin [®] , Azzalure [®] | Xeomin [®] Bocoture [®] | MyoBloc [®] , NeuroBloc [®] |
| Компания | Allergan Inc. (САЩ) | Medicis Pharmaceutical Corp. (САЩ) - Reloxin [®] ; Ipsen Biopharmaceuticals Inc. (Франция) - Dysport [®] , Azzalure [®] | Merz Pharmaceuticals (Германия) | Solstice Neurosciences Inc. (WorldMeds LLC) (САЩ) |
| Тип токсин | A | A | A | B |
| Активна субстанция (мол. тегло) | BoNT-A комплекс (900 kD) | BoNT-A комплекс (500-900 kD) | BoNT-A комплекс (150 kD), без комплексни протеини | BoNT-B комплекс (700 kD) |
| Индикации | Botox Cosmetic [®] - глабеларни линии; Botox [®] - блефароспазъм, цервикална дистония, страбизъм, хронична мигрена, хиперхидроза, уринарна инконтиненция | Блефароспазъм, цервикална дистония, глабеларни линии | Блефароспазъм, цервикална дистония, глабеларни линии | Цервикална дистония, глабеларни линии |
| Страни | Над 75 страни по целия свят, вкл. САЩ и Канада | Над 65 страни, вкл. САЩ, Канада, Русия | САЩ, Германия и други Европейски страни, Мексико, Аржентина | САЩ, Германия и други Европейски страни |

Таблица 10. Сравнителна характеристика на лекарствени препарати, съдържащи ботулинов невротоксин

| Б. | CBTX-A | BONTA | Неуточнена |
|---|--|---|---|
| Комерсиални имена | Prosigne [®] , Lantox [®] | Neuronox [®] | PurTox [®] |
| Компания | Lanzhou Institute of Biological Products (Китай) | Medy-Tox Inc. (Южна Корея) | Mentor Worldwide LLC (САЩ) |
| Тип токсин | A | A | A |
| Активна субстанция (мол. тегло) | BoNT-A (900 kD) | BoNT-A (940 kD) | BoNT-A комплекс (150 kD), без комплексни протеини |
| Индикации | Блефароспазъм, цервикална дистония, глабеларни линии, хиперхидроза | Блефароспазъм | Проучват се |
| Страни | Над 10 страни, вкл. Китай; няма в САЩ и Канада | Южна Корея, Индия, Южна Америка, без САЩ и Канада | В САЩ е в фаза III на клинични проучвания |
| A - широко използвани повсеместно; Б – с ограничено приложение или в процес на одобрение от FDA | | | |

3.4. Имуногенност

- Продуктите с ботулинов невротоксин за терапевтични цели съдържат предимно ботулинов невротоксин тип А, който притежава и най-силно токсично действие.
- По-рядко в продуктите се влага ботулинов токсин тип В.
- При част от пациентите, след серия от приложения на ботулинов токсин-съдържащи продукти, се наблюдава *изразен имунен отговор и проява на резистентност към тези серотипове.*
- *При 1-5% от пациентите, след многократни инжектирания се формират антитела* срещу ботулиновия невротоксин. Това води до нуждата от разработване на продукти с други *антигенни разновидности* на токсина.
- Още 1997 г., *Eleopra R et al.* представят изследване, в което *прилагат лечение с BoNT-C* на пациенти с идиопатичен лицев хемиспазъм и блефароспазъм и отчитат неговата висока ефективност и дълготраен ефект. Изследвания със сходна ефективност са *проведени и с BoNT-F.*

3.5. Терапевтична доза и състав на клиничните препарати

Дозата на препарати, съдържащи ботулинов токсин се изразява в единици биологична активност (U). Една единица ботулинов невротоксин се равнява на леталната доза за 50% (LD50) от група лабораторни мишки с тегло 18 – 22 грама, ако всяка от тях е инжектирана с една единица от токсина. **За възрастен човек тази доза е 2500 – 3000 единици.** Употребата на ботулинов токсин за терапевтични цели е в значително по-ниски дози, които са безопасни за здравето на човека и не се наблюдават странични ефекти на ботулиново отравяне. Прилаганите дози в терапевтичната практика често варират в количество **12 – 100 U на процедура.**

В **състава на препаратите**, съдържащи ботулинов токсин най-често се включва:

- **стерилна лиофилизирана форма на ботулинов токсин.**
- **човешки серумен албумин**, които стабилизира и предпазва невротоксина и намалява абсорбцията му към стената на флакона.
- **натриев хлорид** - добавя се непосредствено преди употреба

Препарати, съдържащи ботулинов токсин имат технологични разлики и различни начини на титриране, но сходен терапевтичен ефект.



3.6. Ефективност и безопасност

По данни на редица изследвания приложението на ботулинов токсин се отличава с **висока ефективност и безопасност**. Изследване проведено от *Sattler et al. (2010)* показва, че при прилагане на BoNT за корекция на глабеларни бръчки при 95,7% (приложен *Onabotulinum toxin A*) и 96,4% (приложен *Incobotulinum toxin A*) е постигнат желаният от пациента и клинициста ефект.

Нежеланите ефекти са рядкост и са обратими. **Фокалната слабост** е единствената по-често срещана нежелана реакция при лечение с ботулинов токсин.

Нежеланите реакции се обобщават с **лека болка и локален оток на мястото на инжектиране, диплопия (двойно виждане), зачервяване, преходна скованост, слабост във врата (1-3% от пациентите), главоболие, неразположение, сухота в устата или леко гадене**. Техният ефект намалява с увеличаване на разстоянието от мястото на инжектиране, макар че е възможна миграция на токсина към близки мускули и други тъкани.

В много редки случаи може токсина да се **разпространи в кръвта**, което да доведе до **слабост в отдалечени мускули или обща слабост**. Необходимо е да се избягват **вътресъдово инжектиране**, тъй като **дифузно разпространение** на големи количества от токсина може да **имитира симптомите на ботулизъм**.



През 2005 година, Cotè et al. правят преглед на 1437 доклада за възникнали странични реакции, вследствие терапия с ботулинов невротоксин от базата данни на FDA:

- 406 са следствие от *терапевтична употреба*:
 - **217 сериозни**, от които **28 смъртни случая**;
 - **189 леки**.
- 1031 са следствие от *козметична употреба*:
 - **36 сериозни** (от които 30 са включени като възможни усложнения в одобрената от FDA листовка. При останалите 6 сериозни нежелани реакции не показват модел, който предполага обща причинно-следствена връзка с ботулинов токсин);
 - **995 леки**. Най-често докладваните са **липса на ефект** (623, 63%), **реакция на мястото на инжектиране** (190, 19%) и **птоза** (111, 11%).
- Това проучване е ограничено главно от възможността за непълно докладване на информация, свързана с възникналите страничните реакции от страна на клиницистите. Възможно е възникването на ефектите да е свързано с отклонения от одобрените от FDA препоръки за дозиране на лекарството, разреждане, боравене, място на инжектиране и съхранение (Cotè et al., 2005).

3.6. Продължителност на терапевтичното действие

Според голяма част от научните публикации, средната продължителност на ефективността от терапевтичното приложение на *продукта е около три - четири месеца*. За поддържане на ефективността са необходими допълнителни приеми на ботулинов невротоксин-съдържащия препарат на *равни интервали*. Те варират в широки граници в зависимост от *дозата и индивидуалната чувствителност*.



Глава 4.

Ботулинов невротоксин в контекста на биотероризма.

1. Потенциални биологични агенти за биотерористични цели

По данни на CDC, биологичните агенти, които са потенциални оръжия на биотероризма, се класифицират в **три категории**:

- Категория А – потенциално най-опасни
- Категория В – с по-нисък рисков потенциал
- Категория С – новооткрити патогени

Биологични агенти Категория А

Тук се включват биологичните агенти, чието разпространение би представлявало най-голям риск за националната сигурност. Те отговарят на следните критерии:

- могат лесно да бъдат разпространявани или **предавани от човек на човек**;
- водят до **висока смъртност** и имат потенциал значително да въздействат върху общественото здраве;
- разпространението им може да предизвика **обществена паника**;
- изискват **специални действия** за опазване на общественото здраве.

| Категория А | |
|---|---|
| Биологичен агент | Заболяване |
| <i>Bacillus anthracis</i> | антракс |
| <i>Clostridium botulinum</i> (ботулинов невротоксин) | ботулизъм |
| <i>Yersinia pestis</i> | чума |
| <i>Variola major</i> | вариола |
| <i>Francisella tularensis</i> | туларемия |
| <i>Filoviruses (Ebola, Marburg)</i> | вирусни хеморагични трески |
| <i>Arenaviruses (Lassa, Machupo)</i> | |
| Категория В | |
| Биологичен агент | Заболяване |
| <i>Brucella spp.</i> | бруцела |
| Бактерии, заплашващи безопасността на храната (<i>Salmonella spp., Escherichia coli O157:H7, Shigella</i>) | салмонелоза, дизентерия и др. на СЧТ |
| <i>Burkholderia mallei</i> | сап |
| <i>Burkholderia pseudomallei</i> | мелиоидоза |
| <i>Chlamydia psittaci</i> | орнитоза |
| <i>Coxiella burnetii</i> | Q-треска |
| <i>Ricinus communis</i> (рицин токсин) | - |
| <i>Staphylococcus</i> (ентеророксин В) | - |
| <i>Clostridium perfringens</i> (епсилон токсин) | - |
| <i>Rickettsia prowazekii</i> | петнист тиф |
| <i>Alphaviruses</i> и др. | вирусни енцефалити (венецуелски / западен конски енцефалит) |
| Бактерии, заплашващи безопасността на водите (<i>Vibrio cholerae,</i> <i>Cryptosporidium parvum</i>) | холера и др. |
| Категория С | |
| Биологичен агент | Заболяване |
| <i>Nipah virus, Hantavirus</i> | нововъзникнали инф. заболявания |

- **Симтоматиката**, свързана с ботулизма, както и други негови характеристики, причисляват *Clostridium botulinum* в категория А на биологичните агенти с потенциал да бъдат използвани за **биологично оръжие**.
- Заболяването се асоциира с **възникване на парализа, нужда от хоспитализация и командно дишане**. При евентуално масово отравяне, болничният ресурс не би могъл да осигури **адекватна хоспитализация** за всички пациенти. Други важни качества на бактерия са неговата изключителна **болетотворна ефективност и методически лесното му производство и транспорт**.
- Смята се, че най-сериозна е заплахата от **аерозолно разпространение на спори на *C. botulinum***, въпреки, че по-често срещана е заболяемостта, причинена от консумацията на контаминирани храни и напитки (т. нар. алиментарен механизъм). Причината е, че **замърсяването на храните и/или водоснабдяването са преносители, свързани със значителни ограничения, включително логистични трудности**.

- Характерната клинична картина с низходяща парализа при заболяемост от ботулизъм, поставя инфекцията в специфична категория. В същото време, обаче, заболяването може да бъде неправилно диагностицирано, пример за което е голямото хранително ботулиново натряване през **1985 година в САЩ**. При тази **епидемия 28 лица**, консумирали храна от едно и също заведение за хранене са развили **ботулизъм**. На почти всички от пациентите са били поставени други неправилни диагнози, преди географски разпръснатото огнище да бъде признато и публикувано в медиите.
- Предполага се, че инхалираният, **аерозолен токсин в повечето случаи не може да се идентифицира в изпражненията и в серума**. Това също е една от причините, поради които се смята, че аерозолната форма би била предпочитана от терористични групи.

Ботулиновият токсин и биологичната война

- През 30-те години на миналия век, японска терористична група заразява с *C. botulinum* храна на затворници в Манджурия (Arnon et al., 2001).
- По време на Втората световна война, американското правителство започна интензивно изследване на биологични оръжия. Разработен е план за използване на китайски проститутки, с помощта на които да **ликвидират високопоставени японски офицери** със смъртоносна доза **ботулинов токсин в желатинова капсула**. Капсулите са тествани на **бездомни магарета**, но тъй като при животните не е настъпвала смърт, проектът е бил отменен (Sotos, 2001).
- В своя статия от 1997 година, Едуард Шанц пише, че „под натиска” на големия интерес на страни от „Axis countries”, особено Германия, към изследването на *C. botulinum* и *B. anthracis* като биологични оръжия, Американската академия на науките създава **лаборатория „Форт Детрик” в Мериленд**. Лабораторията е имала толкова мащабно производство, че са имали ресурса да произвеждат 500 000 бомби, напълнени с антраксни или ботулинови токсини всеки месец (Lane et al., 2001).
- Между 1990 и 1995 година в Япония са докладвани поне три неуспешни опити за използване на **ботулинов токсин в контекста на биотероризма** (Arnon et al., 2002).
- През 90-те години на ХХ век в Ирак са произведени **19 000 литра** течна култура от ботулинов токсин серотип А и част от нея е заредена в **ракети SCUD** (Cohen, 2001).

Литература

Налична е в монографичен труд:

Ерменлиева Н. Ботулинов невротоксин – от отровата до лекарството. Стено. 2018

*"Отровите могат да бъдат използвани
като средство за унищожаване на живота
или като средство за лечение на болните "*
Клод Бернар (Bernard, 1927)

Благодаря Ви за вниманието!

