

Ботулинический токсин: вчера, сегодня, завтра

А.Р. Артеменко¹, А.Л. Куренков²

¹ ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова;

² ФГБУ «Научный центр здоровья детей» РАМН, Москва

Контакты: Ада Равильевна Артеменко aartemenko@gmail.com

Ботулинический токсин (БТ) — бактериальный нейротоксин, представленный 7 серотипами, тормозящий высвобождение нейромедиаторов из нервных окончаний. Серотипы БТ антигенно разнородны и действуют, используя разные, но взаимосвязанные механизмы и не являются взаимозаменяемыми. Механизм действия БТ связан с нарушением нейроэзоцитоза, происходящим в несколько этапов: от связывания БТ на мембране на терминалах аксона со специфическим рецептором до протеолитического ферментного расщепления SNARE-субстрата. Считается, что действие БТ ограничено периферической нервной системой, но в последние годы показано, что БТ, особенно в высоких дозах, влияет на состояние отдельных структур головного мозга. Кроме того, модулируя периферическую афферентацию, БТ может влиять на возбудимость центральных нейрональных структур как на спинальном, так и на корковом уровнях.

В клинической практике и эстетической медицине используется БТ только серотипов А и В. Наибольшее распространение в качестве терапевтического средства получил БТ типа А — для лечения более 100 патологических состояний, проявляющихся мышечной гиперактивностью, гиперфункцией экзокринных желез и хронической болью. Действие препаратов БТ проявляется через 2–5 дней после инъекции, длится 3 мес или дольше и постепенно прекращается в результате фармакокинетических и внутриклеточных репаративных процессов.

Достижения и возможности биотехнологии сегодня позволяют целенаправленно модифицировать белковую молекулярную структуру БТ, что расширяет сферу применения и повышает эффективность терапии с использованием нейротоксинов. Рекомбинантные технологии обеспечивают сочетание основных терапевтических свойств каждого из используемых серотипов БТ и расширяют показания для применения химерных рекомбинантных токсинов.

Ключевые слова: ботулинический токсин, нейротоксин, серотипы ботулинического токсина, нарушение нервно-мышечной передачи, ацетилхолин, SNAP-25, синтаксин, синаптобревин, центральная нервная система, фокальные дистонии, спастичность, хроническая боль, гипергидроз, мимические морщины, рекомбинантные химеры ботулинического токсина

Botulinum toxin: yesterday, today, tomorrow

A.R. Artemenko¹, A.L. Kurenkov²

¹ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University;

² Research Center of Child Health, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Botulinum toxin (BoNT) is a bacterial neurotoxin presented with seven serotypes that inhibit neurotransmitter release from nerve endings. The serotypes of BoNT are antigenically dissimilar, act via different, but interconnected mechanisms, and are not interchangeable. The activity of BoNT is associated with impaired neuroexocytosis occurring in several steps: from the binding of BoNT to its specific receptor on the axon terminal membrane to the proteolytic enzymatic cleavage of SNARE substrate. The effect of BoNT is considered to be restricted to the peripheral nervous system, but when given in particularly high doses, it has been recently shown to affect individual brain structures. In addition, by modulating peripheral afferentation, BoNT may influence the excitability of central neuronal structures at both spinal and cortical levels.

Only BoNT serotypes A and B are used in clinical practice and aesthetic medicine. The type A has gained the widest acceptance as a therapeutic agent for more than 100 abnormalities manifesting themselves as muscular hyperactivity, hyperfunction of endocrine gland, and chronic pain. The effect of BoNT preparations shows itself 2–5 days after injection, lasts 3 months or more, and gradually decreases with as a result of pharmacokinetic and intracellular reparative processes.

Biotechnology advances and potentialities allow purposefully modification of the protein molecular structure of BoNT, which expands the use and efficiency of performed therapy with neurotoxins. Recombinant technologies provide a combination of major therapeutic properties of each used BoNT serotype and expand indications for recombinant chimeric toxins.

Key words: botulinum toxin, neurotoxin, botulinum toxin serotypes, impaired neuromuscular transmission, acetylcholine, SNAP-25, syntaxin, synaptobrevin, central nervous system, focal dystonias, spasticity, chronic pain, hyperhidrosis, mimic wrinkles, recombinant chimeras of botulinum toxin

Токсины — биологически активные вещества природного (микробного, растительного или животного) происхождения, поражающие чужеродную эукариотическую* клетку и не действующие на клетки прокариот**, или синтетические (искусственно созданные человеком) вещества, которые поражают клетки хозяина в исключительно низких концентрациях.

Токсины при многих инфекционных болезнях определяют основные симптомы (например, при ботулизме, дифтерии, коклюше, холере, сибирской язве, столбняке, гемолитико-уремическом синдроме и др.). Однако сегодня накоплены данные, свидетельствующие о возможности выполнения бактериальными токсинами и других функций, таких как защита хозяина от хищников в почвенных/водных сообществах (токсины сине-зеленых водорослей защищают от поедания беспозвоночными животными и рыбами), использование токсинов как антагонистов в микробных сообществах (холерный токсин ингибирует действие ряда бактерий), участие токсинов в авторегуляторных процессах в бактериальных популяциях (энтеротоксин *C. perfringens*) и др. [1].

В зависимости от вида поражаемой ткани токсины делят на несколько групп: энтеротоксины, поражающие клетки тканей желудочно-кишечного тракта; лейкотоксины, поражающие клетки иммунной системы; пневмотоксины, поражающие клетки легочной ткани; кардиотоксины, поражающие клетки сердечной мышцы; нейротоксины, поражающие клетки нервной системы [2]. Нейротоксины представляют собой природные соединения, которые производятся в процессе жизнедеятельности различных организмов, таких как бактерии, грибы, пауки, морские животные, человек, или синтетические.

Среди всех видов токсинов выделяются 2 особые супертоксины — ботулинический и столбнячный, которые считаются последней ступенью в природной эволюции токсинов и представляют собой крупномолекулярные токсины, состоящие из тяжелых и легких цепей, объединенных ковалентными связями. Эти токсины имеют максимально возможную для белков молекулярную массу и токсичность, которая достигнута за счет предельного увеличения размера и сложности молекулы (рис. 1) [3].

Ботулинический нейротоксин

Ботулинический токсин (БТ) представляет собой уникальное природное соединение.

Во-первых, в результате воздействия БТ развивается особая инфекционная болезнь, вызванная не живым возбудителем, а продуктом его жизнедеятельности, накопленном вне организма в различных субстратах (например, БТ в продуктах питания). Именно

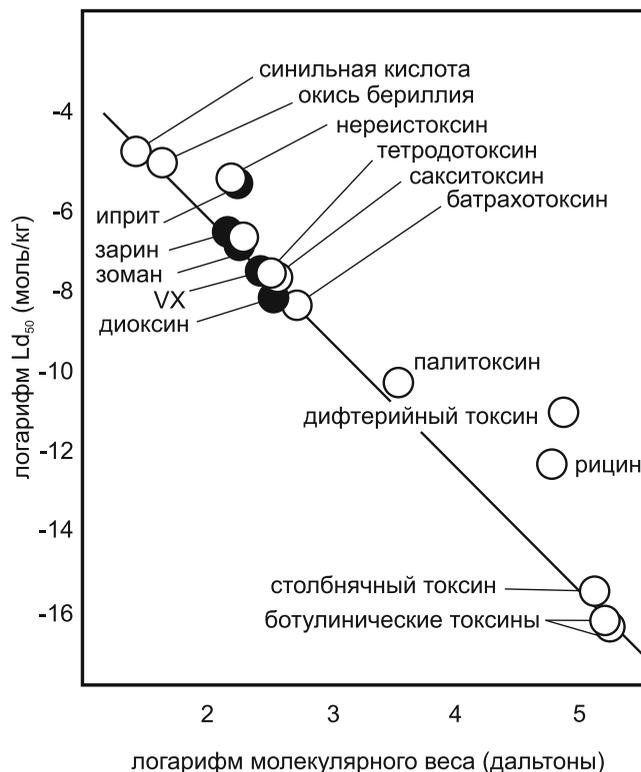


Рис. 1. График токсиды. Максимальная токсичность супертоксинов достигается за счет предельного увеличения размеров и сложности их молекул [3]



Рис. 2. Фотография микропрепарата *Clostridium botulinum*, окраска генцианвиолетом [5]

поэтому БТ издавна ассоциируется с пищевым отравлением, известным как ботулизм, с типичными проявлениями в виде вялых параличей мышц. В патогенезе этого состояния нет инфекционного процесса, а присутствует лишь его составная часть — процесс интоксикации, тяжесть которого определяется подвидом/серотипом БТ и количеством токсина [4].

Во-вторых, БТ — единственный, но исключительный по силе фактор патогенности возбудителя ботулизма *Clostridium botulinum*, анаэробной грамположительной бактерии [5] (рис. 2).

* Эукариоты (лат. eukaryota, от греч. εὖ «хорошо» и κάρυον «ядро»), или ядерные, — домен (надцарство) живых организмов, клетки которых содержат ядра. Все организмы, кроме бактерий и архей, являются ядерными (вирусы и вироиды также не относятся эукариотам, но не все биологи считают их живыми организмами).

** Прокариоты (лат. prokaryota, от др.-греч. πρῶ «перед» и κάρυον «ядро»), или доядерные/предядерные, — одноклеточные живые организмы, не обладающие (в отличие от эукариот) оформленным клеточным ядром.

Таблица 1. Препараты ботулинических нейротоксинов, одобренные FDA для клинического применения в США

БТ	Препарат	Одобренные FDA показания
OnabotulinumtoxinA Первоначальное одобрение FDA: 1989	Botox®	Лечение страбизма у пациентов в возрасте ≥ 12 лет* Лечение блефароспазма, ассоциированного с дистонией у пациентов в возрасте ≥ 12 лет*
		Лечение цервикальной дистонии у взрослых пациентов, для уменьшения выраженности патологической установки головы и боли в шее Лечение тяжелого первичного аксилярного гипергидроза (избыточной потливости), не поддающегося лечению местными средствами у взрослых пациентов Лечение спастичности руки у взрослых пациентов Профилактическое лечение головных болей у взрослых пациентов с хронической мигренью (≥ 15 дней в месяц присутствует головная боль, длящаяся ≥ 4 ч в день) Лечение гиперактивного мочевого пузыря с симптомами ургентного недержания мочи, ургентностью и учащенным мочеиспусканием у взрослых, имеющих неадекватный ответ или непереносимость антихолинергических препаратов Лечение недержания мочи вследствие гиперактивности детрузора, ассоциированного с неврологической патологией (такой, как повреждение спинного мозга, рассеянный склероз) у взрослых, имеющих неадекватный ответ или непереносимость антихолинергических препаратов
OnabotulinumtoxinA Первоначальное одобрение FDA: 2002	Botox® Cosmetic	Временное улучшение при появлении умеренных или выраженных морщин в области <i>glabella</i> у взрослых пациентов в возрасте ≤ 65 лет*
AbobotulinumtoxinA Первоначальное одобрение FDA: 2009	Dysport®	Цервикальная дистония у взрослых, для уменьшения выраженности патологической установки головы и боли в шее у пациентов как получавших, так и не получавших ранее лечение БТ* Временное улучшение внешних проявлений умеренных или выраженных морщин в области <i>glabella</i> у взрослых пациентов в возрасте < 65 лет*
IncobotulinumtoxinA Первоначальное одобрение FDA: 2010	Xeomin®	Цервикальная дистония у взрослых, для уменьшения выраженности патологической установки головы и боли в шее у пациентов как получавших, так и не получавших ранее лечение БТ* Блефароспазм у взрослых, ранее получавших лечение onabotulinumtoxinA* Временное улучшение внешних проявлений умеренных или выраженных глабеллярных морщин или морщин «хмурого взгляда» между бровями у взрослых пациентов
RimabotulinumtoxinB Первоначальное одобрение FDA: 2010	Myobloc®	Цервикальная дистония у взрослых, для уменьшения выраженности патологической установки головы и боли в шее*

* Первоначальное одобрение FDA.

В-третьих, требуется ничтожное количество БТ для развития тяжелого отравления, поскольку он действует как ферментный яд [6]. Так, относительная токсичность для человека при попадании через дыхательные пути ЛД₅₀ = 0,00002 мг · мин/л, при попадании в организм с пищей ЛД₅₀ = 0,0000057 мг/кг. Таким образом, БТ – наиболее токсичное из всех известных на сегодняшний день веществ природного и синтетического происхождения [7].

В-четвертых, несмотря на тысячелетнюю историю борьбы человечества с БТ, до сих пор не найдено эффективного средства борьбы с ним. В мире ежегодно регистрируется около 1000 случаев ботулизма – отравления людей БТ. Но при всех возможностях современной медицины неблагоприятный прогноз при тяжелых формах заболевания может достигать 50–80 % [8].

В-пятых, БТ – высокоустойчивое к повреждающим воздействиям соединение, приспособленное к самосохранению. Так, при обычных условиях во внешней среде он сохраняет свои свойства до 1 года, выдерживая морозы и жару, а в консервированных

продуктах – в течение нескольких лет. БТ устойчив в кислой и нейтральной среде, не инактивируются пищеварительными ферментами в желудке и кишечнике при попадании с пищей, а токсические свойства БТ типа Е под влиянием трипсина в желудке могут усиливаться в сотни раз. БТ выдерживает высокие концентрации поваренной соли (до 18 %), не разрушается в продуктах, содержащих различные специи. Разрушить БТ могут щелочи, кипячение в течение получаса или воздействие калия перманганата, хлора или йода в течение 15–20 мин, формалина – в течение нескольких минут [6].

Выделено 7 серотипов БТ (А, В, С, D, E, F, G), которые продуцируются анаэробной грамположительной бактерией *Clostridium botulinum* и другими видами клостридий. Все серотипы БТ являются металлопротеиназами, которые блокируют освобождение ацетилхолина (АХ) из нервных терминалей, однако их внутриклеточные субстраты, внутриклеточные мишени воздействия и их эффективность существенно разли-

чаются. Серотип А (БТ-А) — наиболее широко изученный и наиболее широко применяемый в клинической практике.

Сегодня ботулинический нейротоксин в качестве лекарственного средства широко используется в клинической практике для лечения неврологических и других расстройств, а также с целью эстетической коррекции. В основном БТ применяется по показаниям, связанным с механизмом действия, который был открыт первым, более 60 лет назад, — хемоденервацией в результате блокирования холинергической передачи в нервно-мышечных и вегетативных постганглионарных синапсах. Парентеральное применение БТ с лечебной целью приводит к релаксации мышц или уменьшению секреции желез в зоне инъекций; клини-

ческие эффекты проявляются в течение 2–5 дней и сохраняются в течение многих месяцев.

Только 2 серотипа БТ — А и В — были одобрены для клинического применения в США Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA). Только 4 продукта на основе данных серотипов БТ утверждены FDA (табл. 1): onabotulinumtoxinA (Botox®, Botox® Cosmetic), abobotulinumtoxinA (Dysport®), incobotulinumtoxinA (Xeomin®) и rimabotulinumtoxinB (Myobloc®). В дополнение к официально зарегистрированным показаниям, перечисленным в табл. 1, в клинических исследованиях показана эффективность препаратов БТ при лечении урологических, скелетно-мышечных, дерматологических и секреторных расстройств, а также бо-

Таблица 2. Препараты ботулинического нейротоксина типа А, одобренные МЗ РФ для клинического применения в России

Препарат	Дата одобрения	Показания
Ботокс®	1994	Блефароспазм
	1994	Гемифациальный спазм
	1994	Цервикальная дистония (спастическая кривошея)
	1994	Страбизм (косоглазие)
Ботокс®	1999	Фокальная спастичность, ассоциированная с динамической деформацией стопы по типу «конская стопа» вследствие спастичности у пациентов 2 лет и старше с детским церебральным параличом , находящихся на амбулаторном лечении
	2006	Коррекция внешнего вида морщин верхней трети лица (межбровных, лобных морщин и периорбитальных морщин типа «гусиные лапки») у взрослых
	2009	Фокальная спастичность запястья и кисти у пациентов, перенесших инсульт
	2013	Облегчение симптомов мигрени, отвечающей критериям хронической мигрени (головные боли присутствуют 15 дней в месяц или более, из них не менее 8 дней — мигрень) при неадекватном ответе на применение профилактических противомигренозных препаратов или их непереносимости
Диспорт®	2013	Недержание мочи у пациентов с нейрогенной гиперактивностью детрузора (нейрогенный мочевого пузыря), в результате хронического субцervикального повреждения спинного мозга или рассеянного склероза
	1999	Блефароспазм
	1999	Цервикальная дистония
	2000	Гемифациальный спазм
Диспорт®	2001	Динамическая деформация стопы, вызванная спастичностью, у детей с церебральным параличом с 2-летнего возраста
	2004	Спастичность руки после инсульта
	2010	Гиперкинетические складки (мимические морщины) лица у взрослых
	2010	Гипергидроз подмышечной области
Лантокс®	2008	Локальные мышечные спазмы
	2008	Блефароспазм
		Цервикальная дистония
		Спастичность мышц верхней конечности
2008	Спастичность мышц нижней конечности	
	Гемифациальный спазм	
	Гиперактивный мочевого пузыря	
2008	Детрузорно-сфинктерная диссинергия	
	Гиперфункциональные мимические морщины	
	Косоглазие	
Лантокс®	2008	Гипергидроз локальный
	2008	Болевые синдромы
	2008	Миофасциальные болевые синдромы
Ксеомин®	2008	Хронические головные боли
	2008	Блефароспазм
	2010	Идиопатическая цервикальная дистония (спастическая кривошея) преимущественно ротационной формы
	2010	Спастичность руки после инсульта
Ксеомин®	2010	Гиперкинетические складки (мимические морщины) лица у взрослых
	2010	Гиперкинетические складки (мимические морщины) лица у взрослых

левых расстройств, в том числе хронической мигрени. Исследования в этих и других областях продолжаются.

В России официально зарегистрированы и применяются в клинической практике 4 продукта на основе одного серотипа БТ — БТ-А: ботокс, диспорт, лантокс, ксеомин. В табл. 2 перечислены официально зарегистрированные в РФ показания для каждого препарата.

Структура молекулы ботулинических нейротоксинов

Серотипы БТ являются антигенно разнородными, используют разные, но взаимосвязанные механизмы действия и не могут быть взаимозаменяемыми. Все 7 серотипов БТ продуцируются бактериальной клеткой в виде неактивной одиночной белковой цепочки — неактивного предшественника, для перевода которого в активное состояние требуется стадия активации. Активация осуществляется при участии протеолитических ферментов, которые в условиях мягкого (ограниченного) протеолиза фрагментируют полипептидную цепь с образованием двух пептидов (субъединиц А и В), выполняющих при взаимодействии токсина с клеткой-мишенью различные функции. Таким образом, фрагментирование, сопровождающееся активацией, приводит к возникновению бифункциональной (или бинарной) молекулярной структуры.

Протеолитическая активация БТ приводит к образованию структуры, состоящей из тяжелой (100 кД) и легкой (50 кД) цепей, соединенных одним дисульфидным мостиком и нековалентными связями [9, 10]. Тяжелая и легкая цепи в целом содержат 3 функциональных фрагмента. Тяжелая цепь содержит домены, предназначенные для связывания со специфическими ганглиозидами и протеиновыми рецепторами пресинаптических терминалей нервов (С-фрагмент) и транслокации (N-фрагмент).

В 1998 г. группа ученых под руководством R.C. Stevens расшифровала кристаллическую структуру нейротоксина (рис. 3), в целом состоящего из 1285 аминокислот (см. рис. 3а) [11].

Примерно 10 лет спустя была опубликована уточненная кристаллическая структура связывающего домена БТ-А в комплексе с его липидным рецептором (см. рис. 3б) [12].

Влияния БТ на нервно-мышечную передачу

Потенциал действия приводит к деполяризации терминали мотонейрона, стимулирует высвобождение АХ (посредством экзоцитоза) из синаптических везикул в синаптическую щель нервно-мышечного синапса. Когда АХ достигает постсинаптической мембраны мышцы и связывается с никотиновыми холинэргическими рецепторами, происходит открытие трансмембранного канала, приток ионов натрия (Na^+) в мышечное волокно и выход ионов калия (K^+). Это начальное понижение мембранного потенциала мышечного волокна генерирует потенциал концевой пластинки, который создает потенциал действия в мышце, вызывая ее сокращение. Никотиновые рецепторы находятся в различных тканях, включая вегетативную нервную систему, нервно-мышечное соединение, мозг у позвоночных. Никотиновые эффекты являются возбуждающими, с быстрым началом и короткой длительностью.

Нейроэксцитоз представляет собой многоступенчатый процесс, который приводит к слиянию синаптических везикул с плазматической клеточной мембраной и происходит при обязательном участии группы белков, называемых SNARE (от *англ.* soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor [NSF] attachment protein receptor) [9] (рис. 4). В нейроэксцитоз вовлекаются 3 основных SNARE-белка: синаптотревин I/II, также известный как везикулоассоциированный мембранный белок (vesicle-associated membrane protein /VAMP), синтаксин 1A/B и синаптосомальный белок 25 (SNAP-25) [9]. После поступления ионов кальция (Ca^{2+}) в нервную терминаль через активированные деполяризацией Ca^{2+} каналы, эти 3 SNARE-белка формируют высокостабильный SNARE-комплекс, который необходим для слияния мембран синаптических везикул с внутренней поверхностью плазматической мембраны. Слияние мембран дает возможность освободиться АХ из синаптических везикул [9, 13] (см. рис. 4а).

Таким образом, нейроэксцитоз, служащий для выделения в синапс нейромедиаторов из накопившихся в клетке транспортных везикул, запускается по определенному сигналу, опосредованному быстрым повышением концентрации ионов кальция в цитозоли клетки. Поэтому данный тип экзоцитоза называется кальцийзависимым экзоцитозом, а SNARE считается специальным кальцийзависимым белковым комплексом.

Механизм, участвующий в связывании БТ с мембраной нервной клетки, включает модель двойного рецептора, в которой корецептор включает ганглиозид и белковый компонент [14]. Связывание БТ с периферическим нервно-мышечным соединением включает

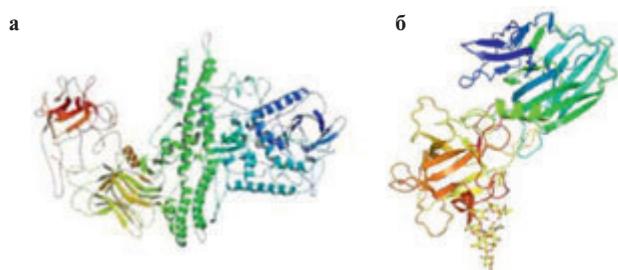


Рис. 3. Кристаллическая структура БТ-А: а — рентгеновская структура всей молекулы нейротоксина БТ-А по разрешению 3.3 Å группы R.C. Stevens Калифорнийского университета [11]; б — кристаллическая структура связывающего домена БТ-А в комплексе с полисахаридным фрагментом ганглиозида GT1b. Связывающий домен БТ-А изображен в виде ленты, раскрашенной в цвета радуги, от синего (N-фрагмент) до красного (С-фрагмент). GT1b полисахарид представлен в виде желтых палочек [12]

жесткие связи между БТ и комплексными полисиалоганглиозидами, которыми, как известно, богаты нейроны [10].

Уникальность БТ состоит в том, что для каждого серотипа существует свой специфический рецептор, расположенный на мембране нервной терминали. Дисиалоганглиозиды (GD1b) и трисиалоганглиозиды (GT1b) обладают аффинитетом (сродством) к структуре связывающего домена в пределах нанометра и устанавливают начальную фиксацию на нейрональной мембране. Серотипы БТ-А, -В, -С и -F связывают GT1b (см. рис. 3б), GD1b и GD1a, серотип Е связывает GT1b и GD1a, серотип D – фосфатидилэтаноламин, а серотип G распознает все ганглиозиды [10]. Таким образом, каждый человек потенциально восприимчив к БТ вследствие филогенетически обусловленного наличия специфических рецепторов, входящих в структуру рецепторных «полей» поверхностей терминалей периферических нервов.

Использование методов точечного мутагенеза для модификации структуры бактериальных токсинов выявило удивительно точную «пригнанность» их структур к выполняемой ими функции. Оказалось, что токсины построены настолько точно, что даже замена одной аминокислоты может привести к катастрофическим изменениям функции. Так, одиночные замены в субъединицах токсина снижают его ферментативную активность и токсичность в 1000 раз, множественные – в 10^6 раз. Одновременно резко снижается его иммуногенность, нарушается пространственная структура и способность взаимодействовать с субстратом [15]. Поэтому чрезвычайно важны технология производства и контроль качества каждой серии лекарственного препарата на основе биологического продукта, содержащего ботулинический нейротоксин.

БТ «входит» в клетку через рецептор на ее поверхности, для чего использует тяжелую цепь (см. рис. 4б) [13]. При попадании БТ в ткани-мишени тяжелая цепь БТ селективно связывается с люминальным доменом белков везикул, которые становятся незащищенными (открытыми, видимыми на поверхности пресинаптических холинергических нервных терминалей). БТ-А связывается с синаптическим везикулярным протеином 2 (SV2) [16], БТ-В – с синаптотагмином [17]. Из серотипов БТ, проявляющих наибольшую долю сходства последовательностей одного и того же белкового рецептора, серотипы А, Е и F связывают SV2, серотипы В и G – Syt I и II [10]. P. Stenmark и соавт. недавно описали связывание на поверхности клетки БТ-G со своим рецептором [18]. Белковый рецептор (или рецепторы) для БТ-С и БТ-D пока остаются неизвестными [10].

После связывания БТ со своим рецептором весь нейротоксин интернализуется в нервную терминаль через эндоцитоз синаптической везикулы. P. Zhang

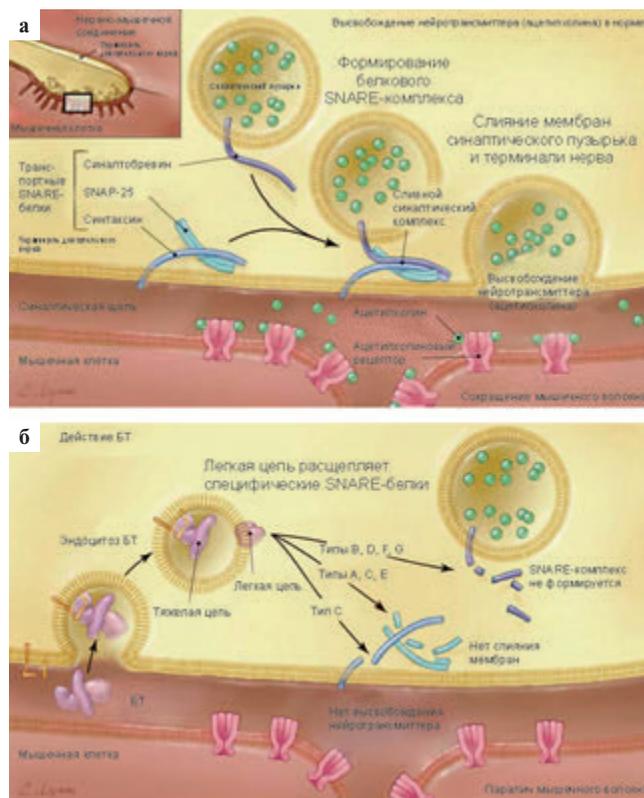


Рис. 4. Нервно-мышечная передача в норме (а) и нарушенная под действием БТ (б) [по 13]

и соавт. представили некоторые доказательства того, что тяжелая цепь БТ-А после интернализации в нейроны остается локализованной в эндосомах [19]. В этом исследовании авторы использовали 2 различные флуоресцентные метки для тяжелой цепи и присоединенного декстрана и выявили при микроскопии, что отмечалась лишь цитозольная транслокация груза, но не тяжелой цепи.

Оказавшись внутри клетки, легкая цепь отделяется от тяжелой цепи (диссоциация). Далее легкая цепь с высокой специфичностью связывается со SNARE-субстратом и протеолитически расщепляет его, полностью нарушая его функции (как связывание SNARE-белков с партнерами, так и обеспечение слияния мембран) (см. рис. 4б и 5) [13, 20]. Соответственно, блокируется нейроэксцитоз АХ из синаптических везикул [21]. Расщепление SNARE делает невозможным слияние везикул и, соответственно, синаптическую трансмиссию, что приводит к тяжелым параличам при ботулизме [10]. В случае же применения БТ как лекарственного средства развиваются дозозависимые временные эффекты, преимущественно ограниченные областью введения, в виде миорелаксации, снижения секреторной активности экзокринных желез, антиноцицептивные влияния. Кроме того, в регуляции активности БТ может играть роль свойственная нейронам динамика концентрации Ca^{2+} , так же как наличие и активность

рецепторов на поверхности клетки, и внутриклеточные субстраты [22].

Белки-мишени различаются в зависимости от серотипа БТ (табл. 3, см. рис. 5). Zn^{2+} -зависимая эндопротеазная активность легкой цепи БТ-А вызывает необратимую блокаду экзоцитоза АХ путем специфического расщепления SNAP-25, в то время как БТ серотипов В, D, F и G расщепляют VAMP [10]. Серотип С является уникальным среди БТ, поскольку расщепляет и SNAP-25, и синтаксин [9].

Предполагаемая трехмерная структура БТ также варьирует среди серотипов, что может объяснять различие в их долговременных эффектах [23].

Эффекты БТ начинают проявляться через 2–5 дней после инъекции, могут длиться 3 мес или дольше, но постепенно ослабевают в результате фармакокинетических и внутриклеточных каталитических процессов. Развивающийся аксональный спраунтинг и расширение концевой пластинки также являются транзиторными феноменами [24]. Способность мотонейронов спинного мозга к спраунтингу после введения в мышцу БТ зависит от нескольких факторов: гистохимического состава мышцы (быстрые или медленные волокна), серотипа БТ, дозы введенного препарата, возраста пациента (у молодых развивается быстрее). Большая длительность эффектов БТ-А по сравнению с другими серотипами БТ может быть связана с длительным периодом сохранения БТ-А своей протеазной активности [24].

БТ оказывает различные влияния на систему мышечного веретена. Инъекция БТ в мышцу приводит к редукции α -мотонейрональной активности на экстрафузальных мышечных волокнах [25]. Мышечные веретена одновременно ингибируются за счет блокады токсином γ -мотонейронального контроля интрафузальных волокон и за счет его последующей редукции афферентного сигнала αI [25, 26].

OnabotulinumtoxinA вызывает атрофию как экстрафузальных, так и интрафузальных мышечных во-

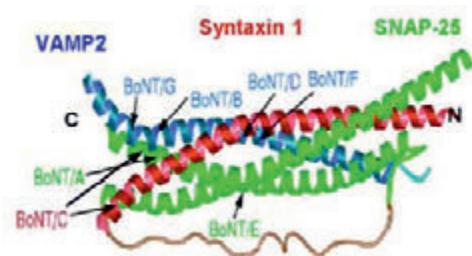


Рис. 5. Тройная параллельная биспиральная структура, образованная синтапобревином, SNAP-25 и синтаксином, выявленная при рентгеновской кристаллографии. Указана локализация мест воздействия разных серотипов БТ, хотя формирование SNARE-комплекса защищает SNARE от протеолиза. Синтапобревин изображен синим цветом, синтаксин — зеленым. Два фрагмента SNAP-25 представлены красным и зеленым и соединены бесформенным/неструктурированным сегментом, не представленным в оригинальной кристаллографической структуре [по 20]

Таблица 3. Внутриклеточные мишени серотипов БТ*

Серотип БТ	Расщепляемые белки
A	SNAP-25
B	VAMP (синаптобревин)
C	SNAP-25, синтаксин 1
D	VAMP
E	SNAP-25
F	VAMP
G	VAMP

* Серотипы БТ-А, -С и -Е расщепляют SNAP-25 на разные пептидные соединения в его карбоксил-терминальном отделе; серотип С дополнительно расщепляет синтаксин; серотипы В, D, F и G расщепляют VAMP/синаптобревин специфично — на отдельные, но разные пептидные соединения.

локон, что было выявлено при инъекции препарата в двуглавую мышцу бедра у лабораторных крыс линии Вистар [26]. Электрическая стимуляция не приводила к возникновению мышечных потенциалов действия ни в экстрафузальных, ни в интрафузальных волокнах; также отмечалось прогрессивное уменьшение разрядов афферентов мышечного веретена. Но необходимо отметить, что процесс атрофии мышечных волокон носит обратимый характер и полностью нивелируется по мере окончания действия БТ и восстановления нервно-мышечной передачи. Инъекции onabotulinumtoxinA продемонстрировали, что терминалы γ -мотонейрона в изолированных жевательных мышцах крыс могут быть заблокированы, в силу этого снижается афферентный сигнал αI и II от системы мышечного веретена и мышечный тонус из-за торможения/ингибирования рефлекса без нарушения силы мышцы [27]. Следовательно, эффект БТ вызван как парезом мышцы, так и торможением спинального рефлекса.

Влияние ботулинического нейротоксина на центральную нервную систему

БТ, вводимый при инъекциях в периферические ткани, не оказывает явных эффектов на активность центральной нервной системы (ЦНС), но существуют не прямые (косвенные) влияния на ЦНС вследствие изменения состояния периферических структур: нервно-мышечного соединения и системы мышечных веретен. Полученные данные свидетельствуют о способности БТ, модулируя периферические сенсорные входы, изменять возбудимость центральных нервных структур как на кортикальном, так и на спинальном уровнях.

У людей onabotulinumtoxinA изменяет сенсорные потоки к ЦНС посредством хемоденервации экстрафузальных и интрафузальных волокон, что было дока-

зано недавними исследованиями [28]. Исследование индуцированной вибрацией фасилитации моторных вызванных потенциалов при регистрации с *m. sternocleidomastoideus* у 20 здоровых лиц и 10 пациентов с ротационной формой идиопатической цервикальной дистонии, получавших лечение abobotulinumtoxinA или onabotulinumtoxinA, подтвердило факт денервации под воздействием БТ как экстрафузальных, так и интрафузальных волокон. Более того, эти результаты подчеркивают значение редукции исходного афферентного потока от мышечного веретена после инъекции БТ, что имеет прямое отношение к клинической эффективности при лечении цервикальной дистонии.

В преклинических исследованиях лечение БТ также приводило к изменению афферентного потока в ЦНС, что являлось результатом влияния на мышечные веретена.

БТ-А также блокирует формирование SNARE-комплекса, необходимого для высвобождения субстанции Р — нейропептида, играющего важную роль в процессах вазодилатации, нейрогенного воспаления и генерации боли [25]. Исследованиями убедительно показано, что индуцированная нейротоксином супрессия субстанции Р, выявляемая в нейронах заднего рога эмбрионов крыс, связана с onabotulinumtoxinA в ингибиторной/блокирующей концентрации, которая существенно ниже, чем для других серотипов; так, ингибиторные концентрации $[IC_{50}]$ для серотипа А 0,05 нМ, серотипа В ~ 60 нМ, серотипа С 0,3 нМ, серотипа F 30 нМ [29]. Связь этой ингибиции с убыванием SNAP-25 подтверждает прямое влияние БТ.

Имеются пока не подтвержденные наблюдения о ретроградном аксональном транспорте БТ в центральных нейронах и мотонейронах, транзитозе к афферентным синапсам, об обнаружении БТ в гиппокампе мышей [30]. Однако, как отмечается в недавних клинических исследованиях, у больных людей, получавших лечение БТ, ретроградный транспорт БТ не был выявлен. Инъекции onabotulinumtoxinA в мышцы верхней половины лица у взрослых пациентов с краνιαльной дистонией приводили к уменьшению мышечных спазмов, однако не оказывали значимого влияния на кортикальный период молчания, который в норме выявляется при транскраниальной магнитной стимуляции [31]. В то же время при введении onabotulinumtoxinA в нижние и верхние конечности у детей с детским церебральным параличом не было выявлено достоверного изменения параметров корковых соматосенсорных вызванных потенциалов, в то время как спастичность мышц значительно уменьшалась [32].

При исследовании терапевтического эффекта БТ при мышечной дистонии было обнаружено влияние на белое вещество головного мозга. Так, часто отмечаемая у пациентов с цервикальной дистонией асимметрия белого вещества полушарий головного мозга после инъекций БТ уменьшалась (восстанавливалась

симметрия). Это дало основание авторам утверждать, что двигательные расстройства приводят к отклонениям в белом веществе и что коррекция двигательного расстройства может положительно влиять на эти отклонения в головном мозге [33].

При попадании БТ в ткань-мишень при инъекции БТ почти полностью связывается с терминалью аксона. Несмотря на это, когда БТ-В применяется при лечении цервикальной дистонии, небольшие фракции введенного БТ распределяются несимметрично и может отмечаться клинически значимый системный антихолинергический побочный эффект [34]. Вегетативные побочные эффекты наблюдаются более часто после инъекций rimabotulinumtoxinB по сравнению с onabotulinumtoxinA. Среди частых побочных эффектов описываются сухость во рту, нарушения аккомодации, ирритация конъюнктивы, уменьшение потоотделения, затруднения при глотании, изжога, запоры, затруднения при мочеиспускании, сухость слизистой носа, молочница (кандидозное поражение).

Однако, несмотря на некоторое системное распределение БТ в организме пациентов, получавших инъекции БТ с лечебной целью, не отмечено прямого влияния БТ на ЦНС. Возможно, это частично определяется размером нейротоксина (150 кДа не может проникнуть через гематоэнцефалический барьер человека).

Хотя принято считать, что сфера влияний БТ ограничена периферической нервной системой, но имеются некоторые доказательства воздействия БТ на высшие структуры в головном мозге, особенно при попадании в организм в высоких дозах [35]. Так, исследования на кошках показали дозозависимый эффект БТ-А на некоторые структуры ствола мозга [36, 37]. Кроме того, некоторые данные позволяют считать основой прямых центральных эффектов БТ-А «дальнедействующий» аксональный транспорт в мотонейронах. F. Antonucci и соавт. показали, что при высоких дозах каталитически активного БТ-А, но не БТ-Е [30], регистрируется ретроградный аксональный транспорт и транцитоз БТ в различные нейроны.

В недавнем экспериментальном исследовании, выполненном на культуре тканей, показано, что БТ-А и БТ-Е подвергаются быстрому аксональному ретроградному транспорту. Этот транспорт обеспечивается многофункциональными транспортными органеллами, которые осуществляют одновременное перемещение различных «грузов» от терминалей нерва к соме нейрона, что является «воротами» для доставки вирусных факторов и патогенных микроорганизмов в ЦНС [38].

Хотя большинство эффектов БТ-А ограничено местом инъекции, выявлены признаки активности БТ-А и в отдаленных синапсах. Например, после инъекции БТ-А в мышцы усом (в области подушечки усом)

у крыс расщепление SNAP-25 было обнаружено в ядрах лицевых нервов [30].

В недавнем исследовании было показано, что инъекции БТ-А в камбаловидную мышцу крысы приводят к билатеральному расслаблению мышц, имеющему дозозависимый эффект. При этом расслабление контралатеральной мышцы следовало за полным торможением ипсилатеральных мышц, в которые вводили БТ-А. В ходе этого исследования использовали 2 типа нейротоксина – A1LL (ботокс) и A2NTX. При использовании A2NTX релаксация ипсилатеральной мышцы крысы развивалась быстрее и была более выражена, чем при применении A1LL. Было обнаружено, что транспорт A1LL в контралатеральные мышцы осуществлялся через невральные пути и через кровь, а транспорт A2NTX происходил только через кровь. Также было продемонстрировано, что и A2NTX, и A1LL были доставлены из периферического нерва в ЦНС посредством anterо- и ретроградного аксонального транспорта [39].

БТ-А может временно изменять возбудимость кортикальных областей, что показано в клинических исследованиях [35]. Так, у пациентов с дистонией выявляются измененные моторные карты, показатели для которых получают методом транскраниальной магнитной стимуляции. У пациентов с дистонией руки после лечения БТ-А отмечено восстановление нормальных кортикальных карт [40].

У пациентов с дистонией руки также обнаружен дефект внутрикоркового торможения, при этом клинический эффект БТ-А коррелировал с восстановлением коркового торможения до уровня показателей здоровых лиц [41]. Эти кортикальные изменения были полностью обратимыми и исчезали с окончанием эффектов БТ-А.

В недавней работе японских исследователей было показано, что ботулинический нейротоксин типа А (A2NTX) тормозит мембранную активность ионных Na-каналов в ЦНС и в спинномозговых ганглиях. Эти результаты свидетельствуют о том, что некоторые подгруппы БТ-А (A2NTX) высокоперспективны для клинического применения в будущем как лечебные средства при эпилепсии и при некоторых типах боли [42].

Возможность комплексного антиноцицептивного механизма БТ-А (на периферическом и центральном уровнях) при лечении болевых синдромов была показана на экспериментальной модели нейропатической боли (хроническое сдавление седалищного нерва у мышей CD1). При периферическом интраплантарном введении БТ-А расщепленный SNAP-25 был обнаружен методом иммуодетекции в терминали периферического нерва, вдоль всего седалищного нерва, в спинномозговом ганглии, в задних рогах спинного мозга. Также было выявлено, что БТ-А модулирует пролиферацию шванновских клеток и тормозит высвобождение ацетилхолина из шванновских клеток, что

подтверждает наличие ретроградного транспорта БТ-А вдоль нерва и показывает возможность его влияния на регенеративные процессы. Полученные данные говорят в пользу использования БТ-А при труднокураемых болевых синдромах, которые значительно снижают качество жизни пациентов [43].

Длительное применение ботулинического нейротоксина и продукция антител

Для достижения наилучших результатов лечение препаратами БТ должно соответствовать индивидуальным потребностям пациента. Тем не менее остаются вопросы по поводу длительного применения БТ и возможности развития вторичной резистентности, когда повторные лечебные инъекции иногда приводят к прогрессирующему снижению терапевтического эффекта. Было показано, что такое снижение эффективности может быть вызвано накоплением нейтрализующих антител к БТ, которые блокируют его биологическую активность [44].

Эти нейтрализующие антитела специфичны для каждого конкретного серотипа БТ в отличие от антител, перекрестно реагирующих против ряда антигенов. Образование антител после повторных процедур инъекций может уменьшить продолжительность действия и степень максимального терапевтического эффекта для последующих процедур с применением БТ [45]. Длительность действия БТ варьирует как среди пациентов, страдающих от одних и тех же заболеваний, так и между теми, кто страдает от различных патологий. В то же время у одного и того же пациента при одинаковых параметрах лечения (дозы, разведения, мышцы-мишени, частота процедур инъекций и др.) длительность эффектов БТ, как правило, постоянная.

Антигенные свойства препаратов БТ зависят от количества БТ, «представленного» иммунной системе, которое, в свою очередь, определяется специфической биологической активностью и соотношением между биологической активностью и количеством общего БТ, содержащегося в препарате [46]. Важно подчеркнуть, что данные большинства исследований, опубликованных по теме наличия антител к БТ-А, представляют результаты, полученные при использовании onabotulinumtoxinA, причем оригинального/первичного состава. Нынешний состав препарата имеет гораздо меньшую белковую нагрузку и, следовательно, ассоциируется со значительным уменьшением продукции антител [47, 48]. Также была исследована иммуногенность БТ-В при длительном применении у пациентов с цервикальной дистонией [49, 50].

Результаты последних исследований с длительным наблюдением за эффектами повторных инъекций показали, что, даже несмотря на возможность развития резистентности к onabotulinumtoxinA, это не является существенной проблемой при надлежащем использовании имеющихся в распоряжении современных препаратов БТ [51].

Важно отметить, что отсутствие ответа на отдельную инъекцию не обязательно означает, что у пациента накопились нейтрализующие антитела. Действительно, в последующие посещения пациент может отреагировать на точно такую же дозу БТ, вводимую в те же мышцы.

Поскольку существует определенное количество совпадений между эпитопом (антигенной детерминантой/реагирующей с антителом части антигена) регионов нейтрализующих антител к onabotulinumtoxinA или abobotulinumtoxinA и rimabotulinumtoxinB, не рекомендуется менять серотипы при использовании БТ в клинической практике, также как выполнять инъекции обоих серотипов одновременно. Применение наименьшей эффективной дозы БТ с интервалами не менее 3 мес способствует уменьшению частоты образования антител.

Перспективы БТ как лекарства: новые химерные (гибридные) нейротоксины

Современные технологии по получению БТ с новыми свойствами можно считать важным шагом в эволюции нейротоксинов и рассматривать не только как исследовательский инструмент, но и как перспективнейшее направление клинической медицины [22, 52, 53]. Изменение фармакологических свойств нейротоксинов при модификации белковой структуры молекулы методами биоинженерии могут значительно увеличить возможности и эффективность основанных на применении нейротоксинов методов лечения в будущем [54, 55].

Основные исследования J. Wang и соавт. доказали существование принципа сшивания/соединения фармакологических свойств разных БТ при использовании методов инжиниринга белков [52]. Замена С-терминали тяжелой цепи БТ у серотипов А и Е привела к созданию двух одноцепочечных химер: химера EA и химера AE. В этом исследовании авторы идентифицировали домены в БТ-А и БТ-Е, которые отвечают за связывание с нейронами и проникновение в нейроны, расщепление SNAP-25 и блокаду нейротрансмиссии [52]. Кроме того, механизм, лежащий в основе быстрого действия БТ-Е, был обнаружен при использовании химер БТ-А и БТ-Е.

Важным примером того, как биоинженерные технологии БТ могут привести к разработке новых и более эффективных методов лечения, основанных на уникальных свойствах нейротоксина, являются доказанное влияние БТ-А и БТ-Е на сенсорные нейроны и доказанная эффективность в лечении хронических болевых синдромов. БТ-А и БТ-Е, когда используются отдельно, неэффективны в блокировании, спровоцированном капсаицином, высвобождения болевых медиаторов из терминалей сенсорных нейронов [9, 24]. Тем не менее с помощью рекомбинантной технологии, сочетая выгодные терапевтические особенности каж-

дого серотипа БТ, удалось разработать химерный рекомбинантный токсин, который эффективно блокирует высвобождение болевых пептидов, например такого, как провоспалительный пептид, связанный с геном кальцитонина (CGRP) (рис. 6) [9, 22]. Капсаицин активирует транзитный рецепторный потенциал ваниллоидных рецепторов 1-го типа (TRPV1) и вызывает освобождение CGRP. Этот процесс зависит от специфических аминокислотных остатков SNAP-25 [22]. БТ-А связывается со своим рецептором, интернализуется и перемещается в цитозоль, где отщепляет 9 аминокислотных остатков от SNAP-25 [9]. Но, несмотря на это, БТ-А не способен эффективно блокировать капсаицининдуцированное высвобождение CGRP из сенсорных нейронов [9, 22], потому что 9 аминокислотных остатков, которые БТ-А отщепляет от SNAP-25, не требуются для высвобождения CGRP, вызываемого уникальным вторым сигнальным мессенджером капсаицина [22].

Напротив, протеазы БТ-Е отщепляют 26 аминокислотных остатков от SNAP-25, которые необходимы для индуцированного капсаицином высвобождения CGRP. Однако БТ-Е неэффективно интернализуется сенсорными нейронами вследствие ограниченного

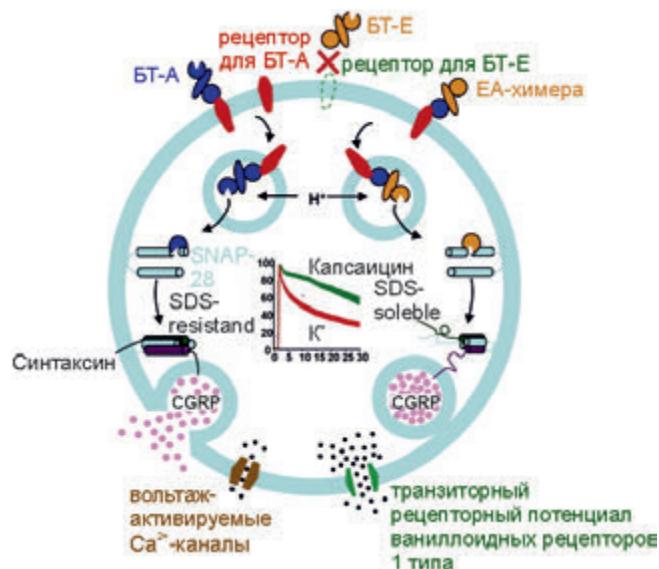


Рис. 6. Рекомбинантная химера EA-химера блокирует высвобождение болевых пептидов. Схематически изображен сенсорный нейрон, который экспрессирует преимущественно рецептор для SV2C, но не SV2A/B, действующий как основной рецептор для БТ-Е. БТ-А связывается с сенсорным нейроном, создает синаптическую везикулу, откуда протеаза легкой цепи БТ-А поступает в цитозоль и расщепляет SNAP-25. Рассеченный SNAP-25 вызывает дестабилизацию SNARE-комплекса (SNAP-25, синтаксин и VAMP), что приводит к блокированию высвобождения CGRP, вызываемого K^+ деполяризацией и поступлением Ca^{2+} . Однако вызванного БТ-А расщепления SNAP-25 недостаточно, чтобы заблокировать индуцированное капсаицином высвобождение CGRP. EA-химера связывается с SV2C-рецептором посредством домена тяжелой цепи БТ-А и проникает в сенсорный нейрон. Далее действует домен от БТ-Е: протеаза легкой цепи отщепляет от SNAP-25 большой фрагмент и блокирует высвобождение CGRP, вызываемое любыми стимулами [по 9]

числа рецепторов к БТ-Е на поверхности этих клеток и, следовательно, не может блокировать капсаицинин-индуцированное высвобождение CGRP из сенсорных нейронов.

Исследование J. Meng и соавт. показало, что рекомбинантная химера БТ-А и БТ-Е (ЕА-химера) способна блокировать вызванное активацией TRPV1 высвобождение пептида, связанного с геном кальцитонина [22, 56].

Ca²⁺-ЕА-химера, состоящая из связывающего домена от БТ-А и протеазного домена от БТ-Е, эффективно интернализируется сенсорными нейронами и ингибирует высвобождение CGRP *in vitro* и *in situ*. Таким образом, мишенью для ЕА-химеры являются ноцицептивные нейроны, что делает этот рекомбинантный нейротоксин перспективным инструментом в терапии боли.

Рекомбинантные нейротоксины и лечение расстройств, не связанных с поражением нервной системы

Инжиниринг производных БТ считается одним из перспективных направлений в развитии новых методов лечения целого ряда заболеваний, которые не ограничиваются неврологическими расстройствами. В основу направления положено использование отдельных свойств нейротоксинов, которые становятся полезными при определенных патологических состояниях. Например, «переориентация» легкой цепи БТ на SNARE-белки, расположенные не в нейронах, а в клетках других органов и систем (на изоформы SNARE). Можно создать легкие цепи БТ, нацеленные на не-нейрональные SNARE-белки, регулирующие, в частности, секрецию слизи в дыхательных путях, инсулина, кислоты в желудке и ионов. Недавнее исследование S. Chen и J. T. Barbieri показало, что после мутации протеазы БТ-Е расщепляет SNAP-23, который не является нейрональным SNARE-белком. Это производное от протеазы БТ-Е ингибирует секрецию муцина в культуре человеческих эпителиальных клеток, что явилось первым доказательством возможности создания лекарственных продуктов на основе производных БТ для лечения гиперсекреторных заболеваний у людей [55].

Предотвращение действия нейротоксина *in vivo*

БТ являются наиболее токсичными из известных сегодня веществ для человека [57, 58]. Ботулизм — отравление людей БТ — остается одним из самых опасных заболеваний человека, несмотря на все открытия в биологии БТ и возможности современной медицины [59].

Высокая токсичность и доступность ботулинических экзотоксинов обусловили применение БТ в качестве биологического оружия еще с середины XX века, а совсем недавно БТ признали потенциальной биотеррористической угрозой для общества по решению

Центров по контролю и профилактике заболеваний (CDC) [60, 61]. Поэтому стратегии по профилактике и лечению ботулизма активно разрабатываются во всем мире.

Доступность БТ обусловлена относительно простым и быстрым процессом получения биологического материала. Так, бактерии *Clostridium botulinum* соответствующего штамма культивируют в бескислородной атмосфере при температуре 30–38 °С на стерилизованной питательной среде, в которую интенсивно выделяется токсин при размножении бактерий. Уже через 7 сут для БТ-А или 5 сут для БТ-Е активность среды достигает 2–3 млн мышинных единиц (количество токсина, вызывающее гибель белой мыши при внутрибрюшинном введении токсина при ее массе 20 г в течение 15 мин) в 1 мл [7].

Инактивация (обезвреживание) токсинов бактерий, в том числе БТ, достигается путем модификации их нативной структуры. Существуют различные способы модификации токсической молекулы, но все они сводятся к изменению функции отдельных частей токсического белка. Модификации токсинов можно достигнуть генетическим путем, химическим и физико-химическим воздействием. Например, гидролиз с образованием нетоксичных полипептидных фрагментов завершается при 80 °С в течение 1 ч, при 100 °С — за 10–15 мин. Скорость гидролиза несколько возрастает в щелочных средах. Широкоизвестное обезвреживание токсинов формалином сводится к нарушению пространственной конфигурации токсического белка за счет возникновения многочисленных сшивок между отдельными участками полипептидной цепи токсина или его отдельными субъединицами. Так, после обработки зараженных поверхностей 10–40 % формалином токсичность снижается на 99 % в течение 1 мин [62, 63].

Наиболее эффективным методом медицинской защиты от БТ является профилактическая иммунизация вакцинами анатоксина. Однако следует иметь в виду, что 10–30 % людей неспособны к иммунизации, а возникновение искусственного иммунитета к БТ у остальных людей достигается лишь в течение 4 нед и более. К тому же в дозах 1000–10 000 ЛД₅₀ даже появившийся искусственный иммунитет может быть преодолен. Кроме того, доменная структура БТ-А дает возможность создания химерных токсинов, защита от которых в случае военного или террористического применения будет значительно затруднена.

Перспективным считается ДНК-терапия ботулизма в виде создания рекомбинантных фрагментов вакцин [60, 61]. Рекомбинантные технологии позволяют в достаточном количестве производить высокоочищенные и высокоэффективные антигены без необходимости культивирования и выполнения сложных манипуляций с большими объемами БТ. В настоящее время полным ходом идет фаза II клинических испытаний рекомбинантной вакцины [60, 61].

Для лечения вызванной БТ интоксикации как на этапе перед предполагаемым воздействием БТ, так и после воздействия БТ могут использоваться малые молекулярные соединения (< 500 Da), способные регулировать каталитическую активность ферментов БТ. Несколько недавних исследований выявили малые молекулы-ингибиторы ферментативной активности БТ. Структура этих молекул представляет интерес как образец для разработки лекарств, которые могли бы быть использованы для инактивации домена протеазы, содержащего цинк [58, 59].

В этом аспекте представляет интерес работа J.C. Koshy и соавт. [64], которые представили 2 соединения (цитрат цинка и фитаза), способные усиливать активность БТ, что было подтверждено результатами двойного слепого плацебоконтролируемого перекрестного исследования с оценкой эффективности 3 препаратов БТ (onabotulinumtoxinA, abobotulinumtoxinA и rimabotulinumtoxinB) при использовании с лечебными целями.

Заключение

Еще вчера БТ рассматривался исключительно как причина потенциально смертельного заболевания — ботулизма.

Сегодня — это уникальное терапевтическое средство природного происхождения, возвращающее тысячам больных людей возможность вести полноценную жизнь. Несмотря на то, что по-прежнему не найдено эффективного способа борьбы с ботулизмом, успехи в изучении нейротоксина, определяющего симптомы болезни, позволяют эффективно предотвра-

щать заражение БТ и, соответственно, снижать число случаев этого потенциально смертельного заболевания. Уточнение молекулярной структуры и механизмов действия БТ, а также получение высокоочищенного токсина позволяют использовать его в качестве эффективного терапевтического средства при самых разных болезнях и состояниях, связанных с мышечной гиперактивностью, гиперфункцией экзокринных желез и хронической болью. Так, сегодня благодаря лекарствам на основе БТ стали курабельными такие неизлечимые заболевания, как дистонии, гемифациальный спазм, детский церебральный паралич и другие спастические состояния, некоторые формы недержания мочи, локального гипергидроза, хроническая мигрень и др.

Ближайшее будущее открывает широкие перспективы разработки средств, защищающих от развития ботулизма в случае любого пути заражения (бытовом, биотеррористическом или при военном применении), что дает надежду на то, что данное заболевание перестанет быть потенциально смертельным. Развитие таких направлений, как синтез химерных рекомбинантных токсинов, а также использование модифицированных форм нейротоксина, его отдельных субъединиц или фрагментов, предполагает возможность получения новых лекарственных форм с заранее заданными свойствами. Это открывает принципиально новые возможности в лечении многих тяжелых заболеваний, например таких, как бронхиальная астма, сахарный диабет, хронические болевые расстройства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бухарин О.В., Литвин В.Ю. Патогенные бактерии в природных экосистемах. Екатеринбург, 1997. 128 с.
2. Руководство по инфекционным болезням. Под ред. Ю.В. Лобзина. СПб., 2000. 932 с.
3. Антонов Н.С. Химическое оружие на рубеже двух столетий. М., 1994. 174 с.
4. Никифоров В.Н., Никифоров В.В. Ботулизм. Л., 1985. 200 с.
5. Супотницкий М.В. Микроорганизмы, токсины и эпидемии. М., 2000. 376 с.
6. Покровский В.И., Авербах М.М., Литвинов В.И. Приобретенный иммунитет и инфекционный процесс. М.: Медицина, 1979. 280 с.
7. Александров В.Н., Емельянов В.И. Отравляющие вещества. М.: Воениздат, 1990. 271 с.
8. Chalk C., Benstead T.J., Keezer M. Medical treatment for botulism. *Cochrane Database Syst Rev* 2011;(3):CD008123. doi:10.1002/14651858.CD008123.pub 2. Review
9. Dolly J.O., Lawrence G.W., Meng J. et al. Neuro-exocytosis: botulinum toxins as inhibitory probes and versatile therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* 2009;9:326–35.
10. Montal M. Botulinum neurotoxin: a marvel of protein design. *Annu Rev Biochem* 2010;79:591–617.
11. Lacy D.B., Tepp W., Cohen A.C. et al. Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nat Struct Biol* 1998;5(10):898–902.
12. Stenmark P., Dupuy J., Imamura A. et al. Crystal structure of botulinum neurotoxin type A in complex with the cell surface co-receptor GT1b—insight into the toxin-neuron interaction. *PLoS Pathog* 2008;4(8):e1000129.
13. Arnon S.S., Schechter R., Inglesby T.V. et al. Working Group on Civilian Biodefense. Botulinum toxin as a biological weapon. Medical and public health management. [Consensus statement] *JAMA* 2001;285(8):1059–70.
14. Aoki K.R., Smith L.A., Atassi M.Z. Mode of action of botulinum neurotoxins: current vaccination strategies and molecular immune recognition. *Crit Rev Immunol* 2010;30(2):167–87.
15. Lobet Y., Cieplak W.Jr., Smith S.G., Keith J.M. Effects of mutations on enzyme activity and immunoreactivity of the S1 subunit of pertussis toxin. *Infect Immun* 1989;57(11):3660–2.
16. Dong M., Yeh F., Tepp W.H. et al. SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A. *Science* 2006;312(5773):540–1.
17. Dong M., Richards D.A., Goodnough M.C. et al. Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells. *J Cell Biol* 2003;162:1293–303.
18. Stenmark P., Dong M., Dupuy J. et al. Crystal structure of the botulinum neurotoxin type G binding domain: insight into cell surface binding. *J Mol Biol* 2010;397:1287–97.
19. Zhang P., Ray R., Singh B.R. et al. An efficient drug delivery vehicle for botulism countermeasure. *BMC Pharmacology* 2009;9:12.
20. Sutton R.B., Fasshauer D., Jahn R., Brunger A.T. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 1998;395:347–53.
21. Dolly J.O., Black J., Williams R.S., Melling J. Acceptors for botulinum

- neurotoxin reside on motor nerve terminals and mediate its internalization. *Nature* 1984; 307:457–60.
22. Meng J., Ovshepian S.V., Wang J. et al. Activation of TRPV1 mediates calcitonin gene-related peptide release, which excites trigeminal sensory neurons and is attenuated by a retargeted botulinum toxin with anti-nociceptive potential. *J Neurosci* 2009;29:4981–92.
 23. Kumaran D., Eswaramoorthy S., Furey W. et al. Domain organization in *Clostridium botulinum* neurotoxin type E is unique: its implication in faster translocation. *J Mol Biol* 2009;386:233–45.
 24. De Paiva A., Meunier F.A., Molgo J. et al. Functional repair of motor endplates after botulinum neurotoxin type A poisoning. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(6):3200–5.
 25. Aoki K.R., Guyer B. Botulinum toxin type A and other botulinum toxin serotypes: a comparative review of biochemical and pharmacological actions. *Eur J Neurol* 2001;8(Suppl 5):21–9.
 26. Aoki K.R. Botulinum toxin: a successful therapeutic protein. *Curr Med Chem* 2004;11:3085–92.
 27. Filippi G.M., Errico P., Santarelli R. et al. Botulinum A toxin effects on rat jaw muscle spindles. *Acta Otolaryngol* 1993;113:400–4.
 28. Urban P.P., Rolke R. Effects of botulinum toxin type A on vibration induced facilitation of motor evoked potentials in spasmodic torticollis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75:1541–6.
 29. Welch M.J., Purkiss J.R., Foster K.A. Sensitivity of embryonic rat dorsal root ganglia neurons to *Clostridium botulinum* neurotoxins. *Toxicon* 2000; 38:245–58.
 30. Antonucci F., Rossi C., Gianfranceschi L. et al. Long-distance retrograde effects of botulinum neurotoxin A. *J Neurosci* 2008;28(14):3689–96.
 31. Allam N., Fonte-Boa P.M., Tomaz C.A., Brasil-Neto J.P. Lack of effect of botulinum toxin on cortical excitability in patients with cranial dystonia. *Clin Neuropharmacol* 2005;28:1–5.
 32. Bockowski L., Okurowska-Zawada B., Sobaniec W. et al. Cortical somatosensory evoked potentials and spasticity assessment after botulinum toxin type A injection in children with cerebral palsy. *Adv Med Sci* 2007;52(Suppl 1):171–5.
 33. Blood A.J., Tuch D.S., Makris N. et al. White matter abnormalities in dystonia normalize after botulinum toxin treatment. *Neuroreport* 2006;17:1251–5.
 34. Dressler D., Benecke R. Autonomic side effects of botulinum toxin type B treatment of cervical dystonia and hyperhidrosis. *Eur Neurol* 2003;49:34–8.
 35. Caleo M., Schiavo G. General effects of tetanus and botulinum neurotoxins. *Toxicon* 2009;54:593–9.
 36. Moreno-Lopez B., de la Cruz R.R., Pastor A.M., Delgado-Garcia J.M. Botulinum neurotoxin alters the discharge characteristics of abducens motoneurons in the alert cat. *J Neurophysiol* 1994;72(4):2041–4.
 37. Moreno-Lopez B., de la Cruz R.R., Pastor A.M., Delgado-Garcia J.M. Effects of botulinum neurotoxin type A on abducens motoneurons in the cat: alterations of the discharge pattern. *Neuroscience* 1997;81(2):437–55.
 38. Restani L., Giribaldi F., Manich M. et al. Botulinum neurotoxins a and e undergo retrograde axonal transport in primary motor neurons. *PLoS Pathog* 2012;8(12):e1003087.
 39. Akaike N., Shin M.C., Wakita M. et al. Transynaptic inhibition of spinal transmission by A2 botulinum toxin. *J Physiol* 2013;591(Pt 4):1031–43.
 40. Byrnes M.L., Thickbroom G.W., Wilson S.A. et al. The corticomotor representation of upper limb muscles in writer's cramp and changes following botulinum toxin injection. *Brain* 1998;121(Pt 5):977–88.
 41. Gilio F., Curra A., Lorenzano C. et al. Effects of botulinum toxin A on intracortical inhibition in patients with dystonia. *Ann Neurol* 2000;48:20–6.
 42. Shin M.C., Wakita M., Xie D.J. et al. Inhibition of membrane Na⁺ channels by A type botulinum toxin at femtomolar concentrations in central and peripheral neurons. *J Pharmacol Sci* 2012;118(1):33–42.
 43. Marinelli S., Vacca V., Ricordy R. et al. The analgesic effect on neuropathic pain of retrogradely transported botulinum neurotoxin A involves Schwann cells and astrocytes. *PLoS One* 2012;7(10):e47977.
 44. Dolimbek B.Z., Steward L.E., Aoki K.R., Atassi M.Z. Immune recognition of botulinum neurotoxin B: antibody-binding regions of the heavy chain of the toxin. *Mol Immunol* 2008;45:910–24.
 45. Dressler D. Clinical presentation and management of antibody-induced failure of botulinum toxin therapy. *Mov Disord* 2004;19(Suppl 8):92–100.
 46. Dressler D., Hallett M. Immunological aspects of Botox, Dysport and Myobloc/NeuroBloc. *Eur J Neurol* 2006;13(Suppl 1):11–5.
 47. Jankovic J., Vuong K.D., Ashan J. Comparison of efficacy of immunogenicity of original versus current botulinum toxin in cervical dystonia. *Neurology* 2003;60:1186–8.
 48. Yablon S.A., Brashear A., Gordon M.F. et al. Formation of neutralizing antibodies in patients receiving botulinum toxin type A for treatment of poststroke spasticity: a pooled-data analysis of three clinical trials. *Clin Ther* 2007;29(4):683–90.
 49. Jankovic J., Hunter C., Dolimbek B.Z. et al. Clinico-immunologic aspects of botulinum toxin type B treatment of cervical dystonia. *Neurology* 2006;67:2233–5.
 50. Atassi M.Z., Dolimbek B.Z., Jankovic J. et al. Molecular recognition of botulinum neurotoxin B heavy chain by human antibodies from cervical dystonia patients that develop immunoresistance to toxin treatment. *Mol Immunol* 2008;45:3878–88.
 51. Brin M.F., Comella C.L., Jankovic J. et al. Long-term treatment with botulinum toxin type A in cervical dystonia has low immunogenicity by mouse protection assay. *Mov Disord* 2008;23:1353–60.
 52. Wang J., Meng J., Lawrence G.W. et al. Novel chimeras of botulinum neurotoxins A and E unveil contributions from the binding, translocation, and protease domains to their functional characteristics. *J Biol Chem* 2008;283:16993–7002.
 53. Band P.A., Blair S., Neubert T.A. et al. Recombinant derivatives of botulinum neurotoxin A engineered for trafficking studies and neuronal delivery. *Protein Expr Purif* 2010;71:62–73.
 54. Muraro L., Tosatto S., Motterlini L. et al. The N-terminal half of the receptor domain of botulinum neurotoxin A binds to microdomains of the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;380:76–80.
 55. Chen S., Barbieri J.T. Engineering botulinum neurotoxin to extend therapeutic intervention. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:9180–4.
 56. Meng J., Wang J., Lawrence G., Dolly J.O. Synaptobrevin I mediates exocytosis of CGRP from sensory neurons and inhibition by botulinum toxins reflects their anti-nociceptive potential. *J Cell Sci* 2007;120:2864–74.
 57. Pier C.L., Tepp W.H., Bradshaw M. et al. Recombinant holotoxoid vaccine against botulism. *Infect Immun* 2008;76(1):437–42.
 58. Lai H., Feng M., Roxas-Duncan V. et al. Quinololin and peptide inhibitors of zinc protease in botulinum neurotoxin A: effects of zinc ion and peptides on inhibition. *Arch Biochem Biophys* 2009;491:75–84.
 59. Roxas-Duncan V., Enyedy I., Montgomery V.A. et al. Identification and biochemical characterization of small-molecule inhibitors of *Clostridium botulinum* neurotoxin serotype A. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:3478–86.
 60. Webb R.P., Smith T.J., Wright P. et al. Production of catalytically inactive BoNT/A1 holoprotein and comparison with BoNT/A1 subunit vaccines against toxin subtypes A1, A2, and A3. *Vaccine* 2009;27:4490–7.
 61. Smith L.A. Botulism and vaccines for its prevention. *Vaccine* 2009;27(Suppl 4):D33–D39.
 62. Далин М.В., Фиш Н.Г. Токсины микроорганизмов. М., 1977. 104 с.
 63. Езепчук Ю.В. Патогенность как функция биомолекул. М.: Медицина, 1985. 240 с.
 64. Koshy J.C., Sharabi S.E., Feldman E.M. et al. Effect of dietary zinc and phytase supplementation on botulinum toxin treatments. *J Drugs Dermatol* 2012;11(4):507–12.