BOTULINUM TOKSIN TIPA A I KOLINERGIČNI SUSTAV

BOTULINUM TOXIN TYPE A AND CHOLINERGIC SYSTEM

LIDIJA BACH-ROJECKY, MAJA RELJA, BORIS FILIPOVIĆ, ZDRAVKO LACKOVIĆ*

Deskriptori: Botulinum toksin, tip A – toksičnost, farmakologija, terapijska upotreba; Neuromuskularna spojnica – učinci lijeka; Kolinergična vlakna – učinci lijeka; Presinaptički terminal – učinci lijeka; Botulizam – dijagnoza

Sažetak. U anaerobnoj bakteriji *Clostridium botulinum* nastaje sedam različitih serotipova botulinum neurotoksina (A-G), koji priječe lučenje acetilkolina iz motoričkih i autonomnih kolinergičnih živaca. Najpoznatije i najviše istraživano mjesto djelovanja botulinum toksina tipa A (BT-A) jest neuromuskularna veza gdje cijepa SNAP-25, jedan od tri ključna proteina pri neuroegzocitozi. Posljedica je dugotrajna paraliza zahvaćene neuromuskularne veze. Iako je BT-A jedna od najtoksičnijih tvari u prirodi koja uzrokuje botulizam, posljednjih dvadesetak godina injiciranje nanogramskih količina u specifične mišiće rabi se u terapiji različitih poremećaja karakteriziranih povećanom mišićnom kontrakcijom, poput distonija, spastičnosti u dječje paralize i sl., ali i u poremećaja autonomnoga živčanog sustava, kao što je hiperhidroza. Dugotrajno djelovanje (nekoliko mjeseci) nakon jednokratne ciljane primjene osnovno je obilježje terapije s BT-A. Iako se o akutnome mehanizmu djelovanja na neuromuskularnu vezu najviše zna, još nije razjašnjeno na koji način BT-A prolazi kroz epitelne barijere, niti koji je mehanizam specifičnog prepoznavanja perifernih kolinergičnih živčanih završetaka. Posebno je važno da mehanizam dugotrajnog djelovanja, što je temelj kliničke uporabe BT-A, za sada nije dovoljno jasan.

Descriptors: Botulinum toxin type A – toxicity, pharmacology, therapeutic use; Neuromuscular junction – drug effects; Cholinergic fibers – drug effects; Presynaptic terminals – drug effects; Botulism – diagnosis

Summary. Anaerobic bacterium *Clostridium botulinum* produces seven different serotypes of botulinum neurotoxins (A-G), which specifically act at the peripheral cholinergic nerve terminals blocking the release of acethylcholine. Primary site of action of botulinum toxin type A (BT-A) is neuromuscular end plate where it specifically cleaves SNAP-25, one of the proteins necessary for neuroegzocytosis. The consequence is long-lasting muscle paralysis. Although BT-A is one of the most potent toxins in nature, over the last 20 years, intramuscular injections of nanogram quantities of BT-A have been used to treat various conditions characterized by increased muscle contraction, like dystonias, spasticity related to cerebral palsy etc but also for autonomic nervous system disorders, like hyperhydrosis. Long duration of action (several months) after peripheral application is the most prominent feature of the toxin's action. Although the acute mechanism of action on neuromuscular junction is largely investigated, there are still some unknowns related to: the passage of BT-A through epithelial barriers, specific recognition of peripheral cholinergic neurons. The mechanism of long duration of action, which is the base of therapeutic use of BT-A, is poorly understood.

Liječ Vjesn 2007;129:407–414

Clostridium botulinum je gram-pozitivna sporogena bakterija koja u anaerobnim uvjetima prelazi u vegetativni oblik te koja stvara sedam različitih serotipova botulinum toksina, i to tip: A, B, C1, D, E, F i G. Ovi toksini djeluju specifično na perifernim kolinergičnim živčanim završecima, gdje priječe egzocitozu acetilkolina. Serotipovi A, B, E i katkad F uzrokuju botulizam u ljudi, dok su serotipovi C, D i E odgovorni za botulizam u drugih sisavaca, ptica i riba. Razlike u osjetljivosti vrsta na pojedine serotipove nisu do kraja objašnjene.[1]

Spore *Clostridium botulinuma* otporne su na visoke temperature, a često se nalaze u zemlji, vodenim nanosima i ribama. U anaerobnim uvjetima, ako sredina nije previše kisela (manja opasnost od zakiseljenih zimnica i sl.), razviju se vegetativni oblici koji stvaraju botulinum toksin(e), čiji je učinak bez liječenja vrlo često smrtonosan.[1]

Ovim preglednim radom prikazat ćemo osnovne osobine djelovanja botulinum toksina tipa A (BT-A) na periferni kolinergični sustav. Upravo je taj učinak temelj trovanja, ali i temelj današnje ciljane terapijske primjene BT-A.

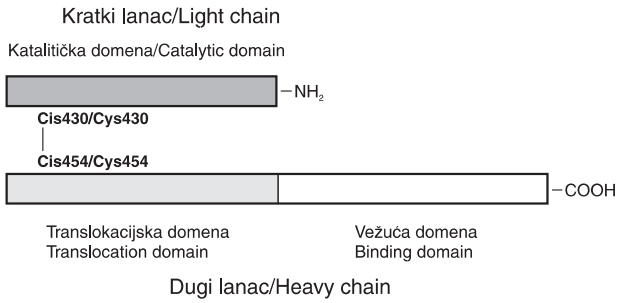
Struktura BT-A

BT-A se stvara kao kompleks od 900 kDa, a čini ga neurotoksična – biološki aktivna komponenta veličine 150 kDa i netoksični proteini. Netoksični proteini nisu fiziološki aktivni, već se smatra da štite biološki aktivni dio molekule od proteolize i denaturacije pri visokoj temperaturi ili kiselom pH, npr. u probavnom sustavu prilikom peroralnog trovanja toksinom. Biološki aktivni dio molekule oblikuju dva lanca povezana disulfidnom vezom, a čini ga 1296 aminokiselina.[2] Dugi lanac, veličine oko 100 kDa, odgovoran je za vezanje neurotoksina za presinaptičke membrane, dok kratki lanac (50 kDa) posjeduje endopeptidaznu aktivnost te specifično cijepa ključne proteine u procesu vezanja sinaptičkih mjehurića s membranom.[3] Trodimenzionalna struktura pokazuje da se aktivni dio BT-A sastoji od tri domene, svaka veličine oko 50 kDa. Dugi lanac čine dvije domene, i to jedna – vežuća domena, odgovorna za vezanje neurotoksina za membranu, dok druga – translokacijska domena omogućuje ulazak toksina u stanicu. Treća, katalitička domena BT-A je aktivna i posjeduje endopeptidaznu aktivnost (kratki lanac) (slika 1).[4]

* **Zavod za farmakologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu** (dr. sc. Lidija Bach-Rojecky, dr. med.); **Klinika za neurologiju Medicinskog fakulteta, KBC Zagreb** (prof. dr. sc. Maja Relja, dr. med.); **Zavod za farmakologiju, Hrvatski institut za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu** (Boris Filipović, cand. med.; prof. dr. sc. Zdravko Lacković, dr. med.)

Adresa za dopisivanje: Prof. dr. sc. Z. Lacković, Zavod za farmakologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Šalata 11, 10 000 Zagreb

Primljeno 27. travnja., prihvaćeno 24. srpnja 2007.



Slika 1. *Shematski prikaz aktivnog dijela molekule botulinum toksina tipa A*
Figure 1. *Structure of active part of botulinum toxin type A*

Botulizam

Od svih sedam serotipova botulinum toksina najotrovniji je BT-A, pri čemu se procjenjuje da je za čovjeka letalna doza kristaličnog toksina oko 70 μg kod peroralnog unošenja, 0,09–0,15 μg zbog intravenske i intramuskularne primjene, odnosno 0,70–0,90 μg ako se inhalira, što ga čini najpotentnijim otrovom u prirodi te predstavlja i prijetnju kao potencijalno bojno oružje.[5] Mehanizam ulaska BT-A u organizam razmjerno je slabo istražen. Toksin u organizam može ući putem probavnog trakta, udisanjem i putem rana.[5,6]

Premda je riječ o velikoj proteinskoj molekuli, ona se uspijeva apsorbirati iz probavnog trakta. Tako BT-A pripada rijetkim proteinskim molekulama koje odolijevaju uvjetima u želucu i crijevima te se uspijevaju apsorbirati i zadržati biološku aktivnost/toksičnost. Nedavnim je istraživanjem fluorescentnim označavanjem molekule toksina i vizualizacijom njegova kretanja kroz probavni sustav pokazano da se toksin veže na apikalnoj površini epitelnih stanica tankog crijeva, nakon čega se internalizira kroz apikalnu membranu (unutar 5 min). Nakon internalizacije, molekule toksina se raspršе po citosolu te migriraju prema bazolateralnoj membrani epitelnih stanica kroz koju prolaze transcitozom nepromijenjene.[7]

Kao i u slučaju stanica probavnog sustava, alveolarne epitelne stanice ili stanice nazalnog epitela vežu i prenose toksin u smjeru bazolateralne membrane gdje on izlazi iz stanica u nepromijenjenu, aktivnom obliku.[8]

Nakon ulaska u sistemsku cirkulaciju, pretpostavlja se da BT-A izlazi iz krvnih žila, difundira kroz izvanstanični prostor te konačno dolazi do ciljnih organa, tj. kolinergičnih živčanih završetaka. Međutim, mehanizam prolaska kroz endotelne barijere još nije dovoljno istražen. Moguće je da se, kao i kod stanica probavnog sustava, radi o endocitozi i transcitozi, a moguć je i paracelularni prolazak. Uvriježeno je mišljenje da BT-A ne prolazi krvno-moždanu barijeru budući da su simptomi botulizma uglavnom posljedica periferne blokade kolinergičnih živaca.

Moguće je razlikovati nekoliko kliničkih tipova trovanja botulinum toksinima – obično ih se spominje pet: klasični botulizam nastao trovanjem hranom *(food-borne botulism)*, infantilni botulizam *(infant botulism)*, skriveni botulizam *(hidden botulism)*, botulizam iz rana *(wound botulism)* te profesionalni botulizam. Godišnje se u SAD-u prijavi oko 200 slučajeva različitih oblika botulizma.[5]

Klasični, i najčešći oblik botulizma, nastaje zbog trovanja hranom kontaminiranom neurotoksinom, i to najčešće konzerviranom hranom kućne proizvodnje (zimnica, kukuruz, šparoge, mrkva, krumpir).[5]

Infantilni, sve češći oblik botulizma, karakterističan je za dojenčad (3–9 mjeseci) zbog specijalnih uvjeta probavnog trakta, a naziva se još i intestinalnim oblikom. Za razliku od klasičnog oblika, riječ je o kombinaciji infekcije i intoksikacije. Iz spora unesenih u organizam putem hrane, u povoljnim uvjetima, razvija se vegetativni oblik bakterije koja *in vivo* stvara toksin. Smatra se da je ovaj oblik botulizma najčešće uzrokovan konzumiranjem meda. Tako su, na primjer, ispitivanja meda u Kaliforniji i Brazilu pokazala da je čak 7% do 10% uzoraka sadržavalo spore *Clostridium botulinuma*.[9,10]

Skriveni botulizam je naziv za intestinalni oblik botulizma, ali u odraslih. Zbog abnormalnih uvjeta u probavnom sustavu, kao što su aklorhidrija, promjene zbog kronične antibiotske terapije ili kirurških zahvata na probavnom sustavu i sl., iz unesenih spora razvija se vegetativni oblik bakterije koji stvara toksin.[5]

Botulizam nastao infekcijom rana sve je češći, posebno zbog sve većeg broja ovisnika o drogama. Ovisnici su zaraženi nizom patogenih organizama, pa tako i s *Clostridium botulinum*, koja je u supkutanom apscesu izvor botulinum toksina. Prvi je put ovaj oblik botulizma opisan kod ovisnika osamdesetih godina u SAD-u, da bi danas postao jedan od češćih oblika botulizma u SAD-u, ali i u Velikoj Britaniji, gdje su od početka 2000. godine do prosinca 2002. godine dijagnosticirana 33 slučaja intoksiciranih ovisnika.[6]

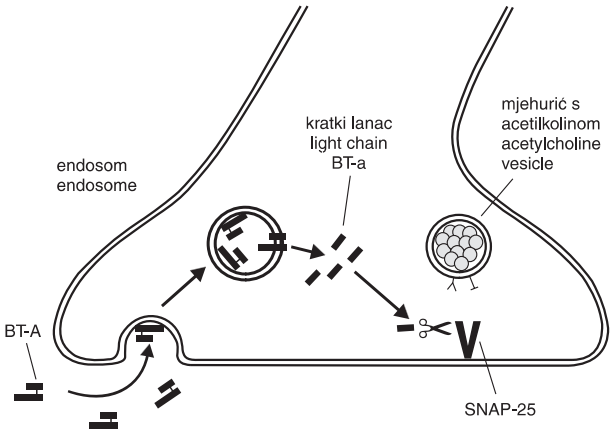
Profesionalni oblik botulizma može nastati zbog izloženosti toksinu u laboratorijima ili pri njegovoj industrijskoj proizvodnji, pri čemu je najčešći put zaraze inhalacija toksina. Blagi oblik botulizma može nastati i kao nuspojava terapijske primjene, a zbog sistemskog širenja toksina.[5]

Kliničke manifestacije botulizma karakteristične su za sve oblike trovanja, a obično se javljaju unutar 12–72 sata, osim kod intestinalnog botulizma gdje je vrijeme inkubacije nepoznato. Botulizam je prepoznat kao trijada znakova: simetrična paraliza koja kreće od kranijalnih mišića, afebrilitet te očuvanost kognitivnih i senzornih funkcija. Simptomi su posljedica paralize motoričkih i autonomnih kolinergičnih neurona: zamućenje vida, dvoslike, ptoza, diplopija, suha usta, teškoće gutanja, disfonija, opća slabost, mučnina, konstipacija, inkontinencija, abdominalna bol, opća mišićna slabost nakon koje nastupa paraliza, koja se postupno descendentno razvija (prvo ramena, pa ruke itd.). Smrt nastupa zbog nemogućnosti disanja koja je posljedica kljenuti dišne muskulature (pa spasonosna može biti mehanička ventilacija).[5,11] Botulizam se katkad pogrešno dijagnosticira kao Guillain-Barréov sindrom, miastenija gravis, moždani udar, Lambert-Eatonov sindrom ili kao intoksikacija depresorima središnjega živčanog sustava. Za terapiju botulizma najvažnija je brza dijagnoza. Terapija je dugotrajna i sastoji se od intenzivne njege koja može zahtijevati i umjetnu ventilaciju tijekom nekoliko mjeseci, a ako je dijagnoza brzo postavljena, ključno može biti davanje antitoksina (protutijela).[11] Danas trovanje botulinum toksinom završava smrtno u 5–10% bolesnika.[1]

Molekularni mehanizam djelovanja BT-A

Mehanizam djelovanja BT-A u presinaptičkom neuronu može se opisati u nekoliko koraka (slika 2).[8,12]

(1) Prvi je korak vezanje botulinum toksina za akceptore (vezna mjesta), za koje je tradicionalno uvjerenje da postoje primarno na staničnim membranama kolinergičnih neurona. Unatoč brojnim istraživanjima potencijalnih veznih mjesta na presinaptičkim membranama, ona su tek djelomično identificirana. Predložen je model dvostrukog receptora, gdje se pretpostavlja da se vežuća domena dugog lanca sa-



Slika 2. *Pretpostavljeni mehanizam djelovanja botulinum toksina tipa A*
Figure 2. *Proposed mechanism of action of botulinum toxin type A*

stoji od dvije poddomene, od kojih se jedna veže za glikoproteine, dok se druga veže za poligangliozide u staničnoj membrani.[12] U slučaju BT-A, *in vitro* je nađeno da se veže na protein označen kao SV2 koji je sastavni dio sinaptičkih vezikula,[13] što bi se slagalo s nekim pretpostavkama da je ulazak botulinum toksina u živčane završetke ovisan o aktivnosti neurona. Naime proteini vezani uz vezikule trebali bi se naći na površini stanice pri egzocitozi sinaptičkog mjehurića.

(2) Nakon specifičnog vezanja, slijede procesi *internalizacije* i *translokacije toksina* u citosol. Toksin se internalizira procesom endocitoze, ovisno o temperaturi i energiji. Proces translokacije započinje promjenama u strukturi toksina pod utjecajem kiselog pH u endosomu, ugradnje toksina u membranu endosoma, translokacije kratkog lanca s luminalne na citosolnu površinu membrane endosoma, redukcije disulfidne veze te konačno odvajanja kratkog od dugog lanca.[12]

(3) Kratki lanac BT-A je specifična endoproteaza ovisna o cinku koja cijepa SNAP-25 (**Sy**-**N**aptosomal **A**ssociated **P**rotein veličine 25 kDa), jedan od tri ključna proteina u procesu neuroegzocitoze. SNAP-25, sinaptobrevin i sintaksini zajedničkim se imenom zovu SNARE (**S**oluble **N**-ethylmaleimid fusion protein **A**ttachment Protein (SNAP) **R**eceptor) proteinima, a omogućuju fuziju membrana sinaptičkog mjehurića i presinaptičke membrane neurona.[14] Osim BT-A, SNAP-25 cijepaju i BT-C1 i BT-E, serotipovi B, D, F i G cijepaju sinaptobrevin ili VAMP (**V**esicule-**A**ssociated **M**embrane **P**rotein), a tip C1 cijepa i sintaksine.

BT-A i neuromuskularna veza

Pod utjecajem BT-A, a zbog nemogućnosti egzocitoze i lučenja acetilkolina, razvija se paraliza neuromuskularne veze. Mišićna vlakna postepeno atrofiraju, dok se motorna ploča povećava. Istodobno dolazi do stvaranja, tj. klijanja (*engl*. sprouting) novih ogranaka motoneurona koji sadržavaju proteine uključene u proces neuroegzocitoze.[12,15]

Remodeliranje neuromuskularne veze započinje klijanjem kratkih ogranaka već 4 dana nakon intramuskularnog injiciranja BT-A. Ogranci se u sljedeća 4 tjedna postepeno povećavaju, protežući se paralelno s longitudinalnom osi mišićnog vlakna te preuzimaju funkciju egzocitoze acetilkolina. Na postsinaptičkim membranama također dolazi do reorganizacije nikotinskih receptora koji su sada smješteni nasuprot novostvorenim funkcionalnim ograncima. Pritom se povećava broj motornih ploča na jednome mišićnom vlaknu, kao i broj vlakana inerviranih jednim motornim aksonom.[15] Postepeno vraćanje funkcije neuroegzocitoze glavnom ogranku primijećeno je tek 2 mjeseca nakon injiciranja BT-A, da bi se potpuno oporavilo nakon sljedećih mjesec ili više dana.

Sinaptička plastičnost uglavnom ovisi o količini sinaptičke aktivnosti na prvotnome, »glavnome« motornom živčanom završetku (onome koji je zbog toksina prestao funkcionirati), pri čemu redukcija ili blokiranje egzocitoze u trajanju od barem 3 dana promovira stvaranje ogranaka, dok vraćanje normalne situacije, tj. ponovna uspostava egzocitoze na glavnome motoneuronu (oko 3 mjeseca za BT-A, nekoliko tjedana za BT-E) uzrokuje propadanje novonastalih živčanih završetaka.[15] Čini se da je sam proces stvaranja novih ogranaka potaknut promjenama u količini intrinzičnih i ekstrinzičnih neurotropnih čimbenika uzrokovanim paralizom, kao što su IGF (prema engl. *insulin growth factor*) I i II u samome mišićnom vlaknu.[16] Međutim, o mehanizmima i molekularnim medijatorima sinaptičke plastičnosti još se premalo zna, a pretpostavlja se da su u regulaciju uključeni i drugi proteini koji posreduju intercelularne interakcije tijekom formiranja, sazrijevanja i održavanja neuromuskularne veze. U svakom slučaju, prestanak funkcije »glavnog završetka«, te izrastanje novih ogranaka važan su model pri studiranju plastičnosti neuromuskularne veze.

BT-A i autonomni živčani sustav

BT-A inhibira otpuštanje acetilkolina i iz kolinergičnih živaca u autonomnome živčanom sustavu (preganglijski simpatički i parasimpatički te postganglijski parasimpatički živčani završeci).[17] Tako može priječiti učinak acetilkolina na egzokrinim žlijezdama, glatkim mišićima i srčanome mišiću. Različitim pretkliničkim eksperimentima ispitivano je djelovanje BT-A na egzokrine žlijezde, glatku muskulaturu različitih organa poput uretre, prostate te na srce (tablica 1). Nazalna primjena BT-A u zamorčadi uzrokuje privremenu degeneraciju nazalnih žlijezda,[18] a smanjuju se i simptomi rinitisa u štakora (nazalna sekrecija, kihanje) te edem i infiltracija upalnim stanicama nazalne sluznice.[19] Injiciranje BT-A u parotidne žlijezde štakora smanjuje sekreciju iz žlijezda slinovnica u trajanju od barem 14 dana bez važnijih morfoloških promjena stanica, a uz smanjenje koncentracije acetilkolinesteraze.[20] Nedavnim je ispitivanjem pokazano da injiciranje BT-A u parotidne žlijezde smanjuje imunoreaktivnost neuronalne dušik-2-oksid (NO) sintetaze te time i stvaranje NO.[21] Injiciranje BT-A u prostatu štakora uzrokuje selektivnu kolinergičnu denervaciju, relaksaciju mišića prostate te dolazi do njezine postepene atrofije.[22] Osim toga, novijim istraživanjem je pokazano da BT-A mijenja staničnu dinamiku uzrokujući apoptozu, inhibira proliferaciju te dovodi do smanjenja broja α1-adrenergičnih receptora u prostati štakora.[23]

Nakon injiciranja u mokraćni mjehur štakora, BT-A inhibira lučenje acetilkolina i noradrenalina iz eferentnih živčanih završetaka donjeg dijela urinarnog trakta, dok nakon injiciranja u uretru blokira lučenje noradrenalina iz simpatičkih živčanih završetaka.[24]

Ispitivanje djelovanja BT-A na glatke mišiće pokazalo je da injiciranje BT-A u Oddijev sfinkter žučnog mjehura[25] te analni sfinkter svinje[26] smanjuje kontrakcije sfinktera. Djelovanje BT-A na srčani mišić ispitivano je nakon injiciranja toksina u sinusatrijski čvor srca psa, pri čemu je inhibiran

Tablica 1. *Pretklinička ispitivanja utjecaja botulinum toksina tipa A na autonomni živčani sustav*
Table 1. *Preclinical investigations of botulinum toxin type A influence on autonomic nervous system*

Pokus/Experiment	Rezultat/Results
Nazalna primjena u zamorčadi /Nasal application in guinea-pigs	privremena degeneracija nazalnih žlijezda i difuzna[18] /temporal degeneration of nasal glands and diffuse reversibile apoptosis;[18]
Nazalna primjena u štakora /Nasal application in rats	smanjenje simptoma alergijskog rinitisa u štakora[19] /reduction of symptoms of allergic rhinitis in rats[19]
Injiciranje u parotidnu žlijezdu štakora /Injection in parotid gland in rats	smanjenje kolinergičke parasimpatičke inervacije i sekrecije tekućine iz žlijezda slinovnica u trajanju od barem 14 dana bez značajnijih morfoloških promjena stanica;[20] smanjenje stvaranja dušik oksida[21] /reduction of cholinergic parasympathetic innervation and secretion of saliva during 14 days without morphological cell changes;[20] inhibition of nitric oxide synthesis[21]
Injiciranje u prostatu štakora /Injection into rat's prostate	selektivna kolinergička denervacija, relaksacija mišića te postepena atrofija prostate;[22] inhibicija proliferacije, apoptoza, smanjenje broja α1-receptora[23] /selective cholinergic denervation, muscle relaxation and prostate atrophy;[22] inhibition of cell proliferation, apoptosis and reduction of α1 receptors[23]
Injiciranje u mokraćni mjehur i uretru štakora /Injection into the bladder and urethra of rats	inhibicija lučenja acetilkolina i noradrenalina iz eferentnih živčanih završetaka donjeg dijela urinarnog trakta u trajanju od 30 dana; inhibicija otpuštanja noradrenalina iz simpatičkih živčanih završetaka uretre[24] /inhibition of egzocytosis of acetylcholine and noradrenaline from efferent parasympathetic nerve endings of lower urinary tract during 30 days; inhibition of noradrenaline secretion from sympahetic nerve endings of urethra[24]
Injiciranje u Oddijev sfinkter svinje /Injection into the pig sphincter of Oddi	inhibirane su kontrakcije sfinktera zbog djelovanja na kolinergičke živčane završetke[25] /inhibition of sphincter contractions upon effect on cholinergic nerve endings[25]
Injiciranje u analni sfinkter svinje /Injection into the pig anal sphincter	smanjenje kontrakcija analnog sfinktera zbog inhibicije simpatičke živčane funkcije[26] /reduction of anal sphincter contractions due to inhibition of sympathetic function[26]
Injiciranje u masno tkivo iznad sinusatrijskog čvora u psa /Injection into the sinoatrial fat-pad in dog	inhibirani su negativni kronotropni odgovori srca nakon stimulacije vagusa[27] /inhibition of negative chronotropic heart responses upon vagus stimulation[27]

negativni kronotropni odgovor srca nakon stimulacije vagusa.[27]

Sinaptička plastičnost, tj. fenomen klijanja se kod autonomnih živaca tek istražuje. Imunofluorescentnom je detekcijom GAP-43 (prema engl. *growth-associated protein 43*) – neuronalnog indikatora stvaranja ogranaka, pokazano da nakon primjene BT-A dolazi do stvaranja novih periglandularnih ogranaka živaca. Međutim, čini se, na osnovi mjerenja imunoreaktivnosti PGP 9,5 proteina (protein gene product 9,5) koji služi kao glavni biljeg regeneracije živčane funkcije, da stvaranje novih ogranaka nije praćeno reinervacijom žlijezde ili da je ona vrlo spora.[17] Na osnovi ovakvih nalaza pokušava se objasniti dugotrajnije (do 18 mjeseci) djelovanje BT-A na znojne žlijezde od onoga na motornoj ploči (3–6 mjeseci).

Klinička primjena BT-A

Nekontrolirano širenje botulinum toksina, kao najjačeg otrova u prirodi, uzrokuje paralizu mišića, dijela autonomnih funkcija i smrt, ako se ne liječi. Međutim, pokazalo se da je moguće vrlo male količine BT-A injicirati u sasvim određeni mišić ili parasimpatički inervirani organ i tako postići reverzibilnu, ali razmjerno dugotrajnu denervaciju koja može biti klinički vrlo korisna.

Medicinski pripravci. Od svih sedam serotipova botulinum toksina, za sada se u terapiji rabe dva, i to tip A (Botox®, Botox Cosmetic® Allergan, SAD; Dysport®, Ipsen, UK; Xeomin®, Merz, Njemačka), i tip B (Myoblock®, Elan Pharmaceuticals, SAD). Potentnost im je izražena u internacionalnim jedinicama (i.j.), pri čemu jedna jedinica odgovara količini toksina koja nakon intraperitonealne primjene prouzroči smrt 50% miševa (1 i.j. Botoxa® odgovara 0,048 ng BT-A). Između različitih komercijalnih pripravaka BT-A postoje određene razlike. Tako jednoj jedinici Botoxa® po potentnosti odgovaraju 3–4 jedinice Dysporta®, a za razliku od ova dva komercijalna pripravka koji sadržavaju BT-A u obliku kompleksa veličine 900 kDa, najnoviji pripravak Xeomin® sadržava samo biološki aktivni dio BT-A veličine 150 kDa.

Indikacije za primjenu BT-A

Indikacije za kliničku primjenu BT-A opisane su na tablici 2. Povoljno djelovanje BT-A, injiciranog u ekstraokularne mišiće u pacijenata sa strabizmom, prvi je opisao Scott početkom osamdesetih godina prošlog stoljeća.[28] Pokazalo se da u određenih tipova strabizma terapija s BT-A značajno smanjuje potrebu za kirurškom korekcijom. Djelotvornost i sigurnost terapije s BT-A u pacijenata s blefarospazmom pokazana je dvostruko slijepim pokusom kontroliranim placebom iz 1987. godine.[29] Učinak BT-A nastupio je unutar 5 dana od injiciranja u *m. orbicularis oculi*, a trajao je 3–4 mjeseca.

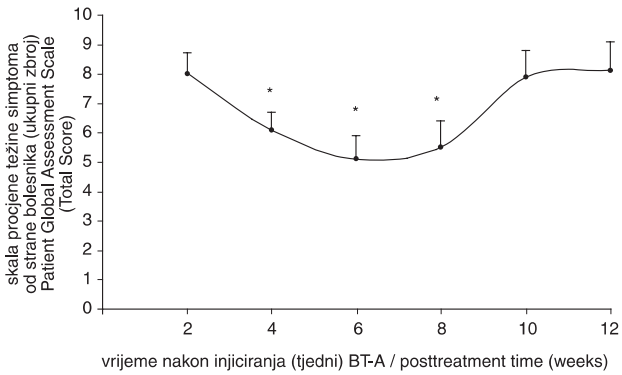
Lokalna primjena BT-A pokazala se djelotvornom i sigurnom i u liječenju hemifacijalnog spazma (»periferna distonija«) primarnog, ali i sekundarnog oblika – nastalog zbog kompresije ili iritacije facijalnog živca, a karakteriziranog nevoljnim, unilateralnim, nepravilnim toničkim ili kloničkim kontrakcijama mišića inerviranih facijalnim živcem.[30]

Terapijska primjena BT-A je za navedene poremećaje odobrena 1989. godine od Američke agencije za hranu i lijekove (FDA – Food and Drug Administration).

Tsui i sur. prvi su 1986. godine u kontroliranim uvjetima pokazali djelotvornost primjene BT-A u liječenju cervikalne distonije ili spastičkog tortikolisa, najučestalijeg oblika fokalne distonije.[31] Distonija je treći po učestalosti poremećaj pokreta u čovjeka. Zahvaća sve dobne skupine, posebice radno aktivnu populaciju, a bez mogućnosti djelotvorne medikamentne terapije. Primjena BT-A značajno je utjecala na kvalitetu života ovih bolesnika i radnu sposobnost. Istraživanje Relje i suradnika[32] pokazalo je da se statistički značajno olakšanje simptoma cervikalne distonije, navedeno od samih bolesnika, bilježi četvrtog tjedna nakon injiciranja BT-A, a traje tijekom slijedeća 4 tjedna (slika 3). Najveći broj otvorenih, kao i kontroliranih studija ispitivanja djelotvornosti BT-A u cervikalnoj distoniji odnosi se

Tablica 2. *Klinička primjena BT-A (odobrena i neodobrena – u fazi ispitivanja) te tip neurona odgovoran za djelovanje*
Table 2. *Clinical use of BT-A (approved and off-label) and type of neuron associated with the effect*

	Odobrena /Approved	Tip neurona /Type of neuron
Strabizam[28] /Strabismus		Motoneuroni /Motoneurons
Fokalne distonije: /Focal dystonias	Blefarospazam[29] /Blepharospasm Cervikalna distonija[31,32,33,34] /Cervical dystonia	Motoneuroni /Motoneurons
Hemifacijalni spazam[30] /Hemifacial spasm		Motoneuroni /Motoneurons
Kozmetička primjena – bore[35,36] /Cosmetics-facial lines		Motoneuroni /Motoneurons
Dječja cerebralna paraliza[37,38] /Cerebral palsy in children		Motoneuroni /Motoneurons
Autonomni poremećaji /Autonomic disorders	Primarna aksilarna hiperhidroza[43,45] /Primary axillary hyperhidrosis	Autonomni /Autonomic
	Neodobrena /Off-label	
Ostale fokalne distonije Other focal dystonias	Laringalna[39] Laryngeal Profesionalne[40] Professional	Motoneuroni /Motoneurons
Esencijalni tremor ruku[42] /Essential tremor of hands		Motoneuroni /Motoneurons
Spastičnost: /Spasticity	Multipla skleroza[41] /Multiple sclerosis	Motoneuroni /Motoneurons
Autonomni poremećaji: /Autonomic disorders	Fokalna hiperhidroza[44] /Focal hyperhydrosis Hipersalivacija[46,47] /Hypersalivation Hiperlakrimacija[48] /Hyperlacrimation Freyev sindrom[49] /Frey's syndrome	Autonomni /Autonomic
Gastrointestinalni poremećaji: /Gastrointestinal system disorders	Ahalazija[52,53] /Achalasia Analne fisure[54,55] /Anal fissurae Spazam rektalnog sfinktera[56,57] /Anismus	Autonomni /Autonomic
Urološki poremećaji: /Urological disorders	Neurogena hipereaktivnost mjehura i inkontinencija[59,60] /Neurogenic bladder hyperactivity and incontinence Benigna hiperplazija prostate[61] /Benign prostate hyperplasia Vaginizam[62] /Vaginismus	Autonomni /Autonomic
Bolna stanja: /Pain conditions	Bol u distonija[63] /Painful dystonias Miofascijalna bol[64] /Myofascial pain Piriformni sindrom[65] /Pyriformis syndrome Kronična bol donjeg dijela leđa[66] /Chronic low back pain Tenzijska glavobolja[67–69] /Tension headache	Motoneuroni /Motoneurons Senzorni? /Sensory neurons?
	Migrena[70,71] /Migraine Neuropatska bol[72] /Neuropathic pain Intersticijski cistitis[73] /Interstitial cystitis	Senzorni? /Sensory?



Slika 3. *Smanjenje težine simptoma u bolesnika s cervikalnom distonijom mjereno kvantitativnom skalom od samih bolesnika (tzv. Patients Global Assessment Scale – GAS).*
* p<0,05 (modificirano prema Relja i Klepac 2002)[32]
Figure 3. *Decrease of symptoms in patients with cervical dystonia measured by the Patients Global Assessment Scale (GAS).*
* p<0.05 (modified according to Relja and Klepac 2002)[32]

na istraživanje neželjenih učinaka, kao i ograničenja terapije toksinom, ali i načine i mjesta injiciranja, djelotvorne doze te trajanje učinka.[33,34] Primjena BT-A u liječenju cervikalne distonije odobrena je od FDA 2000. godine.

Odabir i identifikacija mišića za primjenu BT-A u liječenju raznih oblika fokalnih distonija najvažniji su preduvjet uspješnosti terapije. Potrebno je naglasiti da je to simptomatska terapija fokalnih distonija, odnosno nekontrolirane mišićne kontrakcije. U prosjeku, injiciranje BT-A u liječenju fokalnih distonija ponavlja se svaka 3–4 mjeseca. Za sada, nije dovoljno jasno da li nastup i trajanje učinka BT-A ovisi o dozi, obliku spasticiteta i sl.

BT-A (Botox® Cosmetic, Allergan, SAD) odobren je za primjenu u kozmetičke svrhe 2002. godine, i to samo za smanjenje intenziteta »frown lines« između obrva. Osim toga, danas se primjenjuje i za smanjenje izraženosti facijalnih bora te za korekciju asimetrije lica zbog ozljeda frontalnog ili drugih ogranaka facijalnih živaca.[35,36]

Primjena BT-A odobrena je u više od 40 zemalja, uključujući europske zemlje i Kanadu (u SAD-u nije odobrena) u terapiji spastičnosti kod dječje paralize. U 70–82% djece je nakon intramuskularnog injiciranja BT-A primijećena redukcija spastičnosti, smanjena je bolnost, a značajno je povećana kvaliteta života pacijenata.[37,38]

Uspješnost terapije s BT-A ispituje se i u drugih oblika fokalnih distonija[39,40] te kod spasticiteta u multiple skleroze,[41] kod pacijenata s esencijalnim tremorom ruku[42] i sl.

U kliničkoj primjeni BT-A bitno su novi pokušaji uporabe toksina radi učinaka na autonomne kolinergične živce, ponajprije u različitih sekretornih poremećaja, kao što su hiperhidroza dlanova,[43] stopala[44] ili aksila,[45] hipersalivacija,[46,47] hiperlakrimacija.[48] U multicentričnom pokusu kontroliranom placebom kod 145 ispitanika s primarnom aksilarnom hiperhidrozom, za što je primjena BT-A i odobrena od FDA 2004. godine, intradermalno injiciranje BT-A (100–200 i.j.) smanjuje sekreciju znoja iz apokrinih aksilarnih znojnih žlijezda oko šest puta.[45] Intradermalna primjena BT-A u ljudi ne mijenja veličinu, niti broj tubula znojnih žlijezda, tj. ne dovodi do njihove atrofije, za razliku od atrofije mišića do koje dolazi nakon intramuskularnog injiciranja toksina, ali se značajno smanjuje lumen tubula.[17] Djelovanje može trajati do godinu ili dvije od injiciranja jedne doze BT-A.[38] Intraparotidno injiciranje BT-A (15–30 i.j.) značajno smanjuje hipersalivaciju kod djece s cerebralnom pa-

ralizom te kod parkinsoničara.[46,47] Novija klinička opažanja upućuju na moguće povoljno djelovanje BT-A u rijetkih poremećaja, poput Freyeva sindroma,[49] facijalne kromhidroze,[50] ali i kod simptoma u pacijenata s rinitisom.[51]

Neke kliničke studije su pokazale da bi se različiti gastrointestinalni poremećaji, kao što su ahalazija[52,53] i druga spastična stanja ezofagusa, kronične analne fisure,[54,55] opstipacija kod spazma rektalnog sfinktera[56,57] mogli uspješno liječiti lokalnim injiciranjem BT-A.

U novije vrijeme sve je više dokaza o djelotvornosti lokalne terapije s BT-A kod različitih genitourinarnih poremećaja praćenih povećanom spastičnošću sfinktera, kao što su neurogena inkontinencija uzrokovana hiperrefleksijom detruzora,[58–60] benigna hipertrofija prostate[61] te vaginizam.[62]

Mehanizam djelovanja toksina u navedenih poremećaja povezan je s privremenom kemodenervacijom perifernih kolinergičnih živčanih završetaka na neuromuskularnoj vezi ili autonomnome živčanom sustavu. Još nije jasno je li ulazak toksina u stanicu uvjetovan njezinom aktivnošću, što bi imalo za posljedicu brži nastup djelovanja BT-A u kliničkim stanjima povećane živčane aktivnosti. Međutim, u ljudi paralitičko djelovanje BT-A injiciranog izravno u kontrahirani mišić nastupa tek nakon nekoliko dana (5–7), dok pri trovanju hranom simptomi botulizma nastupaju najčešće 12 do 72 sata nakon konzumiranja kontaminirane hrane (u nekim slučajevima može proći i više dana). Nakon primjene u zdravi mišić pokusnih životinja, BT-A uzrokuje paralizu 12–24 sata nakon injiciranja.[15] Je li riječ o razlikama između vrsta ili različitoj brzini nastupa djelovanja na zdravi i bolesni mišić za sada je teško objasniti te je očita potreba za dodatnim istraživanjima.

Treba spomenuti da se tijekom posljednjih godina povećava broj nalaza o povoljnom djelovanju BT-A kod različitih bolnih stanja koja prate spasticitet, kao npr. u distonija,[63] miofascijalnog spazma,[64] piriformisnog sindroma,[65] boli mišićno-koštanog podrijetla,[66] ali i u boli koje nisu praćene povećanom mišićnom kontrakcijom. Tako danas postoje opažanja da BT-A djeluje u bolesnika s kroničnom tenzijskom glavoboljom,[67–69] migrenom,[70,71] neuropatskom boli,[72] te u intersticijskom cistitisu[73] (tablica 2). Međutim, ovi antinociceptivni učinci nisu posredovani kolinergičnim živcima i njihov mehanizam nastanka je u vrlo ranim fazama istraživanja[74–76] pa ih nećemo prikazati u ovome preglednom članku.

Trajanje učinka BT-A

Kliničke su studije pokazale da, nakon jednokratne primjene, BT-A djeluje dugotrajno (3–6 mjeseci nakon intramuskularnog davanja, a i do 18 mjeseci nakon intradermalne primjene kod hiperhidroze). Mehanizmi dugotrajnog djelovanja, kao i razlike u trajanju, ovisno o mjestu primjene i indikaciji, nisu dovoljno jasni. Prema jednim pretkliničkim istraživanjima, duljina učinka je posredovana dugotrajnim zadržavanjem aktivnih proteolitičkih jedinica BT-A u neuronima,[77] međutim, riječ je o mjesecima. Prema drugima, dugotrajno djelovanje BT-A posljedica je različite brzine stvaranja novih funkcionalnih SNAP-25 proteina.[78] Novija su istraživanja pokazala da fragmenti SNAP-25_A, nastali cijepanjem 9 aminokiselina na SNAP-25 s BT-A, ulaze u interakcije s ostalim SNARE proteinima, međutim, ta veza nije funkcionalna i ne uzrokuje egzocitozu, nego se oblikuju dugotrajno nefunkcionalni kompleksi koji onemogućuju pristup i preuzimanje funkcije novostvorenim molekulama SNAP-25.[79] Ukratko, iako postoji više pretpostavki, još nema konačnog objašnjenja dužine djelovanja BT-A – koja je glavni razlog njegove kliničke primjene.

Za sada se ne može objasniti ni prestanak djelovanja, tj. sudbina biološki aktivnoga kratkog lanca BT-A u presinaptičkoj stanici. Mogućnosti kao što su transport kratkog lanca duž aksona ili njegova moguća proteoliza u citosolu ili lizosomima zahtijevaju dodatna istraživanja.

Sigurnost terapije s BT-A

Metaanaliza učinjena na 2 309 ispitanika (iz 36 kontroliranih, randomiziranih studija primjene BT-A u različitim terapijskim indikacijama, kao što su distonija, hiperhidroza, glavobolja, cerebralna paraliza i dr.) upozorila je na sigurnost i podnošljivost terapije s BT-A.[80] Nuspojave blagog do srednje jakog intenziteta bile su zastupljene u oko 25% pacijenata tretiranih s BT-A te u 15% ispitanika kontrolne skupine. Nuspojave su bile kratkotrajne, nesistemske, a najčešće je prijavljena lokalna mišićna slabost okolnih mišića, vjerojatno nastala zbog difuzije toksina s mjesta primjene.[80] Tako je najčešća nuspojava primjene BT-A kod blefarospazma i strabizma ptoza vjeđa i obrva, dok je disfagija najčešća kod liječenja tortikolisa. Međutim, postoje zabilježeni slučajevi sistemskih nuspojava karakteriziranih simptomima blagog botulizma,[81] a pokazano je, također, da BT-A uzrokuje smanjenje srčanog ritma.[82]

Stvaranje antitijela zabilježeno je u 3–10% pacijenata, a najčešće se događa u pacijenata injiciranih visokim dozama, kao i kod čestih reinjiciranja, i to u intervalima manjim od 3 mjeseca te kod dugotrajne terapije s BT-A.[83]

Zaključak

BT-A, uzročnik botulizma i jedna od najotrovnijih tvari u prirodi, u posljednjih je 20-ak godina postao vrijedno terapijsko sredstvo u stanja karakteriziranih povećanom mišićnom kontrakcijom. Mehanizam terapijskog, kao i toksičnog djelovanja je isti, tj. inhibicija lučenja acetilkolina na perifernim kolinergičnim živčanim završecima. Međutim, još uvijek postoji mnogo bitnih pitanja na koja istraživanja nisu uspjela odgovoriti. Neka od njih uključuju mehanizme ulaska toksina u organizam i prolaska kroz endotelne barijere, identifikaciju veznih mjesta na membranama neurona, zatim prestanak djelovanja toksina te sudbinu biološki aktivnog kratkog lanca u presinaptičkom neuronu. Najveća zagonetka je još uvijek dužina djelovanja, koja je i najvažniji temelj kliničke primjene BT-A.

LITERATURA

1. *Anonimno.* Botulism. WHO Fact Sheet No. 270:2002.
2. *Turton K, Chaddock JA, Acharya KR.* Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. Trends Biochem Sci 2002;27:552–8.
3. *Dolly O.* Synaptic transmission: inhibition of neurotransmitter release by botulinum toxins. Headache 2003;43:S16–S24.
4. *Lacy DB, Stevens RC.* Sequence homology and structural analysis of the clostridial neurotoxins. J Mol Biol 1999;291(5):1091–104.
5. *Working Group on Civilian Biodefense.* Botulinum toxin as a biological weapon. Medical and public health management. JAMA 2001;285: 1059–70.
6. *Brett MM, Hallas G, Mpamugo O.* Wound botulism in the UK and Ireland. J Med Microbiol 2004;53:555–61.
7. *Ahsan CR, Hajnoczky G, Muktar M, Maksymowych AB, Simpson LL.* Visualisation of binding and transcytosis of botulinum toxin by human intestinal epithelial cells. J Pharmacol Exp Ther 2005;315(3):1028–35.
8. *Simpson LL.* Identification of the major steps in botulinum toxin action. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2004;44:167–93.

9. *Schocken-Iturrino RP, Carneiro MC, Kato E, Sorbara JO, Rossi OD, Gerbasi LE.* Study of the presence of the spores of *Clostridium botulinum* in honey in Brasil. FEMS Immunol Med Microbiol 1999;24: 379–82.
10. *Chin J, Arnon SS, Midura TF.* Food and enviromental aspects of infant botulism in California. Rev Infect Dis 1979;1:692–7.
11. *Maselli RA, Bakshi N.* Botulism. Muscle Nerve 2000;23:1137–44.
12. *Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C.* Neurotoxins affecting neuroexocytosis. Physiol Rev 2000;80:718–38.
13. *Dong M, Yeh F, William H i sur.* SV2 Is the Protein Receptor for Botulinum Neurotoxin A, Published online March 16 2006; 10.1126 / science. 1123654 (Science Express Reports)
14. *Montecucco C, Schiavo G, Pantanp S.* SNARE complexes and neuroexocytosis: how many, how close? Trends Biochem Sci 2005;30:367–72.
15. *de Paiva A, Meunier FA, Molgo J, Aoki KR, Dolly JO.* Functional repair of motor endplates after botulinum neurotoxin type A poisoning: biphasic switch of synaptic activity between nerve sprouts and their parent terminals. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96(6):3200–5.
16. *Carroni P, Schneider C, Kiefer MC, Zapf J.* Role of muscle insulin-like growth factors in nerve sprouting: suppression of terminal sprouting in paralyzed muscle by IGF-binding protein 4. J Cell Biol 1994;125 (4):893–902.
17. *Swartling C, Naver H, Pihk-Lundin I, Hagforsen E, Vahlquist A.* Sweat gland morphology and periglandular innervation in essential palmar hyperhidrosis before and after treatment with intradermal botulinum toxin. J Am Acad Dermatol 2004;51:739–45.
18. *Rohrbach S, Olthoff A, Laskawi R, Giefer B, Gotz W.* Botulinum toxin type A induces apoptosis in nasal glands of guinea pigs. Ann Otol Rhinol Laryngol 2001;110:1045–50.
19. *Wen WD, Yuan E, Hou YP, Song YF.* Experimental studies for botulinum toxin type A on allergic rhinitis in the rat. Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi 2004;39(2):97–101
20. *Ellies M, Laskawi R, Tormahlen G, Gotz W.* The effect of local injection of botulinum toxin A on the parotid gland of the rat:an immunohistochemical and morphometric study. J Oral Maxillofac Surg 2000; 58:1251–6.
21. *Ellies M, Schutz S, Quondamatteo F, Laskawi R.* Immunohistochemical investigations of the influence of botulinum toxin A on the immunoreactivity of nNOS in the parotid gland of the rat. J Oral Maxillofac Surg 2006;64(3):397–401.
22. *Doggweiler R, Zermann D-H, Ishigooka M, Schmidt RA.* Botox-induced prostatic involution. Prostate 1998;37:44–50.
23. *Chuang YC, Huang CC, Kang HY i sur.* Novel action of botulinum toxin on the stromal and epithelial components of the prostate gland. J Urol. 2006;175:1158–63.
24. *Smith CP, Franks ME, McNeil BK i sur.* Effect of botulinum toxin A on the autonomic nervous system of the rat lower urinary tract. J Urol 2003;169:1896–900.
25. *Sand J, Nordback P, Arvola P, Porsti I, Kalloo A, Pasricha P.* Effect of botulinum toxin A on the sphincter of Oddi: an in vivo and in vitro study. Gut 1998;42:507–10.
26. *Jones OM, Moore JA, Brading AF, Mortensen NJ.* Botulinum toxin injection inhibits myogenic tone and sympathetic nerve function in the porcine internal anal sphincter. Colorectal Dis 2003;5(6):552–7.
27. *Tsuboi M, Furukawa Y, Kurogouchi F, Nakajima K, Hirose M, Chiba S.* Botulinum neurotoxin A blocks cholinergic neurotransmission in the dog heart. Jpn J Pharmacol 2002;89:249–54.
28. *Scott AB.* Botulinum toxin injection of eye muscles to correct strabismus.Trans Am Ophthalmol Soc 1981;79:734–70.
29. *Jankovic J, Orman J.* Botulinum A toxin for cranial-cervical dystonia: a double-blind, placebo-controlled study. Neurology 1987;37(4):616–23.
30. *Wang A, Jankovic J.* Hemifacial spasm: clinical correlates and treatments. Muscle Nerve 1998;21:1740–7.
31. *Tsui J, Elisen A, Stossel A, Calne D.* Double-blind study of botulinum toxin in spasmodic torticollis. Lancet 1986;2:245–7.
32. *Relja M, Klepac N.* Botulinum Toxin Type A Improves Life Quality and Rehabilitation in Painful Cervical Dystonia. U: Battistin L, Dam M, Tonin P, ur. Proceedings of the 3rd World Congress in Neurological Rehabilitation. Venice; 2002, str. 111–4.
33. *Jankovic J.* Treatment of cervical dystonia with botulinum toxin. Mov Disord 2004;19:S109–S115.
34. *Costa J, Espirito-Santo C, Borges A i sur.* Botulinum toxin type A therapy for cervical dystonia. Cochrane Database Syst Rev 2005;1: CD003633.
35. *Carruthers A, Carruthers J.* Botulinum toxin type A for the treatment of glabellar rhytides. Dermatol Clin 2004;22(2):137–44.
36. *Benedetto AV.* The cosmetic uses of botulinum toxin type A. Int J Dermatol 1999;38:641–55.
37. *Koman LA, Paterson Smith B, Balkrishnan R.* Spasticity associated with cerebral palsy in children: guidelines for the use of botulinum A toxin. Pediatr Drugs 2003;5:11–23.
38. *Wasiak J, Hoare B, Wallen M.* Botulinum toxin A as an adjunct to treatment in the management of the upper limb in children with spastic cerebral palsy. Cochrane Database Syst Rev 2004;4:CD003469.
39. *Courey MS, Garrett CG, Billante CR i sur.* Outcomes assessment following treatment of spasmodic dysphonia with botulinum toxin. Ann Otol Rhinol Laryngol 2000;109:819–22.
40. *Djebbari R, du Montcel S-T, Sangla S, Vidal JS, Gallouedec G, Vidailhet M.*Factors predicting improvement in motor disability in writer's cramp treated with botulinum toxin. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2004;75:688–91.
41. *Lamotte D, Thoumie P.* Multiple sclerosis and botulinum toxin. Ann Readapt Med Phys 2003;46:299–302.
42. *Brin MF, Lyons KE, Doucette J i sur.* A randomized, double masked, controlled trial of botulinum toxin type A in essential hand tremor. Neurology 2001;56:1523–8.
43. *Saadia D, Voustianiouk A, Wang AK i sur.* Botulinum toxin type A in primary palmar hyperhidrosis. Randomized, single-blind, two-dose study. Neurology 2001;57:2095–9.
44. *Naumann M, Jost W.* Botulinum toxin treatment of secretory disorders. Mov Disord 2004;19Supp l 8:137–41.
45. *Naumann MK, Lowe NJ.* Effect of botulinum toxin type A on quality of life measures in patients with excessive axillary sweating: a randomized controlled trial. Br J Dermatol 2002;147:1218–26.
46. *Bothwell JE, Clarke K, Dooley JM i sur.* Botulinum toxin A as a treatment for excessive drooling in children. Pediatr Neurol 2002;27:18–22.
47. *Pal PK, Calne DB, Calne S i sur.* Botulinum toxin A as a treatment for drooling saliva in PD. Neurology 2000;89:1659–63.
48. *Keegan DJ, Geerling G, Lee JP, Blake G, Collin JR, Plant GT.* Botulinum toxin treatment for hyperlacrimation secondary to aberrant regenerated seventh nerve palsy or salivary gland transplantation. Br J Ophthalmol 2002;86(1):43–6.
49. *Arad-Cohen, Blitzer A.* Botulinum toxin treatment for symptomatic Frey's syndome. Otolaryngol Head Neck Surg 2000;122:237–40.
50. *Matarasso SL.* Treatment of facial chromhidrosis with botulinum toxin type A. J Am Acad Dermatol 2005;52:89–91.
51. *Unal M, Sevim S, Dogu O, Vayisoglu Y, Kanik A.* Effect of botulinum toxin type A on nasal symptoms in patients with allergic rhinitis: a double-blind, placebo-controlled clinical trial. Acta Otolaryngol 2003;123 (9):1060–3.
52. *Schiano TD, Parkman HP, Miller LS i sur.* Use of botulinum toxin in the treatment of achalasia. Dig Dis 1998;16:14–22.
53. *Martinek J, Siroky M, Plottova Z, Bures J, Hep A, Spicak J.* Treatment of patients with achalasia with botulinum toxin: a multicenter prospective cohort study. Dis Esophagus 2003;16(3):204–9.
54. *Arroyo A, Perez F, Serrano P, Candela F, Lacueva J, Calpena R.* Surgical versus chemical (botulinum toxin) sphincterotomy for chronic anal fissure: long-term results of a prospective randomized clinical and manometric study. Am J Surg 2005;189:429–34.
55. *Thornton MJ, Kennedy ML, King DW.* Prospective manometric assessment of botulinum toxin and its correlation with healing of chronic anal fissure. Dis Colon Rectum 2005;48(7):1424–31.
56. *Ron Y, Avni Y, Lukovetski A i sur.* Botulinum toxin type-A in therapy of patients with anismus. Dis Colon Rectum 2001;44(12):1821–6.
57. *Albanese A, Maria G, Bentivoglio A i sur.* Severe constipation in Parkinson's disease relieved by botulinum toxin. Mov Disord 1997;12: 764–6.
58. *Jost WH, Naumann M.* Botulinum toxin in neuro-urological disorders. Mov Disord 2004;19Supp18:142–5.
59. *Schurch B, de Seze M, Denys P i sur*. Botox Detrusor Hyperreflexia Study Team. Botulinum toxin type A is a safe and effective treatment for neurogenic urinary incontinence: results of a single treatment, randomized, placebo controlled 6-month study. J Urol 2005;174:196–200.
60. *Grosse J, Kramer G, Stohrer M.* Success of repeat detrusor injections of botulinum A toxin in patients with severe neurogenic detrusor overactivity and incontinence. Eur Urol 2005;47:653–9.
61. *Chuang YC, Chiang PH, Huang CC, Yoshimura N, Chancellor MB.* Botulinum toxin type A improves benign prostatic hyperplasia symptoms in patients with small prostates. Urology 2005;66(4):775–9.
62. *Ghazizadeh S, Nikzad M.* Botulinum toxin in the treatment of refractory vaginismus. Obstet Gynecol 2004;104(5):922–5.
63. *Jankovic J, Schwartz K.* Botulinum toxin injections for cervical dystonia. Neurology 1990;40(2):277–80.
64. *Lang AM.* A preliminary comparison of the efficacy and tolerability of botulinum toxin serotypes A and B in the treatment of myofascial pain syndrome: a retrospective, open-label chart review. Clin Ther 2003;25 (8):2268–78.
65. *Childers MK, Wilson DJ, Gnatz SM, Conway RR, Sherman AK.* Botulinum toxin type A use in piriformis muscle syndrome: a pilot study. Am J Phys Med Rehabil 2002;81(10):751–9.
66. *Foster L, Clapp L, Erickson M, Jabbari B.* Botulinum toxin A and chronic low back pain: a randomized double blind study. Neurology 2001;56:1290–3.

67. *Relja M.* Treatment of tension-type headache by local injection of botulinum toxin. Eur J Neurol 1997;4:S71–S73.
68. *Rollnik JD, Tannerberger O, Schubert M, Schneider U, Dangler R.* Treatment of tension-type headache with botulinum toxin type A: double-blinded placebo-controlled study. Headache 2000;40:300–5.
69. *Relja M, Telarovic S.* Botulinum toxin in tension-type headache. J Neurol 2004;25:I/12–I/14.
70. *Binder WJ, Brin MF, Blitzer A, Schoenrock LD, Pogoda JM.* Botulinum toxin type A (BOTOX) for treatment of migraine headaches: an open-label study. Otolaryngol Head Neck Surg 2000;123(6):669–76.
71. *Evers S, Vollmer-Haase J, Schwaag S, Rahmann A, Husstedt IW, Frese A.* Botulinum toxin A in the prophylactic treatment of migraine – a randomized, double-blind, placebo-controlled study. Cephalalgia 2004;24 (10):838–43.
72. *Klein AW.* The therapeutic potential of botulinum toxin. Dermatol Surg 2004;30:452–5.
73. *Smith CP, Radziszewski P, Borkowski A, Somogyi GT, Boone TB, Chancellor MB.* Botulinum toxin A has antinociceptive effects in treating interstitial cystitis. Urology 2004;64:871–5.
74. *Bach-Rojecky L, Relja M, Lackovic Z.* Botulinum toxin type A in experimental neuropathic pain. J Neural Transm 2005;112:215–9.
75. *Bach-Rojecky, Lackovic Z.* Antinociceptive effect of botulinum toxin type A in rat model of the carrageenan and capsaicin induced pain. Croat Med J 2005;46:55–62.
76. *Cui M, Khanijou S, Rubino J, Aoki KR.* Subcutaneous administration of botulinum toxin A reduces formalin-induced pain. Pain 2004;107(1–2): 125–33.
77. *Foran PG, Mohammed N, Lisk GO i sur.* Evaluation of the therapeutic usefulness of botulinum neurotoxin B, C1, E and F compared with the long lasting type A. J Biol Chem 2003;278:1363–71.
78. *Eleopra R, Tugnoli V, Rossetto O, De Grandis D, Montecucco C.* Different time courses of recovery after poisoning with botulinum neurotoxin serotypes A and E in humans. Neurosci Lett 1998;256:135–8.
79. *Meunier FA, Lisk G, Sesardic D, Dolly JO.* Dynamics of motor nerve terminal remodeling unveiled using SNARE-cleaving botulinum toxins: the extent and duration are directed by the sites of the SNAP-25 truncation. Mol Cell Neurosci 2003;22:454–66.
80. *Naumann M, Jankovic J.* Safety of botulinum toxin type A: a systematic review and meta-analysis. Curr Med Res Opin 2004;20:981–90.
81. *Bhatia KP, Münchau A, Thompson PD i sur.* Generalised muscular weakness after botulinum toxin injections for dystonia: a report of three cases. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1999;67:90–3.
82. *Meichsner M, Reichel G.* Effect of botulinum toxin A and B on vegetative cardiac innervation. Fortschr Neurol Psychiatr 2005;73(7):409–14.
83. *Borodic G, Johnson E, Goodnough M i sur.* Botulinum toxin therapy, immunologic resistance, and problems with available materials. Neurology 1996;46:26–9.

* * *

Vijesti
News

HRVATSKI LIJEČNIČKI ZBOR
Klinika za psihološku medicinu
Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
Institut za psihosomatsku medicinu Zagreb

organiziraju

PRVI HRVATSKI PSIHOTERAPIJSKI KONGRES
Izazovi psihoterapije u stoljeću uma

Zadar, Falkensteiner, Club Borik
22.—25. svibnja 2008.

Okvirne teme: Biološke osnove psihoterapije • edukacija u psihoterapiji • istraživanje u psihoterapiji • psihosomatika i liaison psihoterapija • psihoterapijski pristup djeci i adolescentima • dugotrajna psihoterapija • psihoterapija i farmakoterapija • psihoterapija kod različitih psihičkih poremećaja • psihoterapija žalovanja i kriznih stanja • uloga psihoterapije u obiteljskoj medicini • etički i pravni aspekti psihoterapije • psihoterapija i umjetnost • psihoterapija i mediji • zavist u psihoterapiji.

Rok za prijavu sažetaka: 1. ožujka 2008.

Tehnički organizator: Danijela Ćurčić, Penta d.o.o., A. Hebranga 20/I, 10 000 Zagreb
tel. 01/4553 290, fax. 01/4553 284, mob. 091 4553 290,
e-mail: danijela@penta-zagreb.hr, web: www.penta-zagreb.hr

Kontakt: Prof. Barbara Kalenić, Klinika za psihološku medicinu, KBC Zagreb, Kišpatićeva 12, 10 000 Zagreb
tel. 01/2388 752, fax. 01/2335 818,
e-mail: bkalenic@kbc-zagreb.hr, web: www.ipsm.hr