

# Clostridium botulinum

---

**Jurin, Magdalena**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, Faculty of Science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:166:015421>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-23**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Science](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Splitu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Odjel za biologiju

Magdalena Jurin

***CLOSTRIDIUM BOTULINUM***

Završni rad

Split, rujan 2022.

Ovaj rad, izrađen u Splitu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Ane Maravić, predan je na ocjenu Odjelu za biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja prvostupnica biologije i kemije.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Završni rad

Sveučilište u Splitu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Odjel za biologiju

### *CLOSTRIDIUM BOTULINUM*

Magdalena Jurin

#### SAŽETAK

Rod *Clostridium* čine sporogene, gram-pozitivne, anaerobne štapićaste bakterije. Pripadnici ovog roda imaju industrijski i medicinski značaj, obzirom da proizvode opasne toksine. Vrsta *Clostridium botulinum* široko je rasprostranjena, a proizvodi najotrovniji poznati toksin, botulinski neurotoksin, koji zbog jedinstvenih farmakoloških obilježja ima široku primjenu u medicini te u estetskim zahvatima. Botulinski je neurotoksin uzrok rijetkog, ali potencijalno fatalnog stanja, botulizma. Botulizam je stanje paralize koja je posljedica inhibicije otpuštanja neurotransmitera acetilkolina. Osim botulizma, opasnost botulinskog neurotoksina nalazi se i u potencijalnoj ulozi bioterorističkog oružja.

**Ključne riječi:** botulinski neurotoksin, botulizam, bioterorizam

Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

**Rad sadrži:** 20 + VI stranica, 3 slike i 14 literaturnih navoda. Izvornik na hrvatskom jeziku.

**Mentor:** Izv. prof. dr. sc. Ana Maravić, Prirodoslovno-matematički fakultet u Splitu

**Neposredni voditelj:** Mia Dželalija, mag. educ. biol. et chem., Prirodoslovno-matematički fakultet u Splitu

**Ocjenjivači:** Izv. prof. dr. sc. Ana Maravić, Prirodoslovno-matematički fakultet u Splitu

Mia Dželalija, mag. educ. biol. et chem., Prirodoslovno-matematički fakultet u Splitu

Dr. sc. Tomislav Rončević, Prirodoslovno-matematički fakultet u Splitu

**Rad prihvaćen:** 26. rujna, 2022.

## Basic documentation card

Bachelor thesis

University of Split  
Faculty of Science  
Department of biology

### *CLOSTRIDIUM BOTULINUM*

Magdalena Jurin

#### ABSTRACT

The genus *Clostridium* consists of sporogenous, gram-positive, anaerobic bacteria. Members of this genus have industrial and medical importance but also produce very dangerous toxins. The species *Clostridium botulinum* is widely distributed and produces the most venomous known toxin, botulinum neurotoxin. Due to its unique pharmacological properties, botulinum neurotoxin is widely used in medicine and in aesthetic procedures. Botulinum neurotoxin is the cause of rare and potentially fatal condition, botulism. Botulism is a condition of paralysis resulting from inhibition of the acetylcholine release. In addition to botulism, the danger of botulinum neurotoxin is also in its potential role as a bioterrorist weapon.

**Keywords:** botulinum neurotoxin, botulism, bioterrorism

Thesis deposited in library of Faculty of Science, University of Split

**Thesis consists of:** 20 + VI pages, 3 figures and 14 references. Original language: Croatian

**Supervisor:** Ana Maravić, Ph.D., Assoc. Prof., Faculty of Science, University of Split

**Assistant supervisor:** Mia Dželalija, mag. educ. biol. et chem., Faculty of Science,  
University of Split

**Reviewers:** Ana Maravić, Ph.D., Assoc. Prof., Faculty of Science, University of Split  
Mia Dželalija, mag. educ. biol. et chem., Faculty of Science, University of Split  
Tomislav Rončević, Ph.D. Faculty of Science, University of Split

**Thesis accepted:** September 26, 2022.

## **IZJAVA**

kojom izjavljujem s punom materijalnom i moralnom odgovornošću da sam završni rad s naslovom

### ***CLOSTRIDIUM BOTULINUM***

izradila samostalno pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Ane Maravić. U radu sam primijenila metodologiju znanstveno-istraživačkog rada i koristila literaturu koja je navedena na kraju završnog rada. Tuđe spoznaje, stavove, zaključke, teorije i zakonitosti koje sam izravno ili parafrazirajući navela u završnom radu na uobičajen, standardan način, citirala sam i povezala fusnotama s korištenim bibliografskim jedinicama. Rad je pisan u duhu hrvatskog jezika.

Studentica

Magdalena Jurin



## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. RAZRADA TEME.....	2
2.1. Rod <i>Clostridium</i> .....	2
2.2. Najznačajnije vrste klostridija u humanoj medicini .....	3
2.3. Morfološka obilježja vrste <i>Clostridium botulinum</i> .....	5
2.3.1. Mikromorfologija .....	5
2.3.2. Kolonijalna morfologija .....	6
2.4. Uzgoj i rasprostranjenost <i>C. botulinum</i> .....	7
2.5. Klinička slika botulizma.....	8
2.6. Faktori virulencije .....	10
2.7. Botulinski neurotoksin .....	11
2.7.1. Struktura .....	12
2.7.2. Djelovanje .....	13
2.7.3. Primjena .....	14
2.7.4. Toksičnost .....	17
2.7.5. Prijetnja bioterorizma .....	18
3. ZAKLJUČAK .....	19
4. LITERATURA.....	20



# 1. UVOD

Bakterije su prokariotski mikroorganizmi koji su široko rasprostranjeni i mogu se naći u tlu, vodi, živim organizmima i drugdje. Napretkom znanosti, otkrivena su mnoga korisna svojstva bakterija pa pojedine bakterijske vrste ili sojevi široku upotrebu danas imaju u medicini, farmaciji, industriji i poljoprivredi.

S druge strane, jedan dio bakterija patogen je i uzrokuje široki spektar oboljenja kod biljaka, životinja te ljudi. Svaka patogena vrsta ima svoje karakteristične faktore virulencije i mehanizme kojima izaziva štetne učinke na živi organizam. Mnoge bakterijske vrste pri tome proizvode toksine koji mogu biti iznimno opasni.

Danas, kao i tijekom povijesti, bakterije su uzročnici velikog broja infekcija, pojedinačnih slučajeva, epidemija ili čak pandemija. Sporogene bakterijske vrste predstavljaju posebnu opasnost zbog mogućnosti preživljavanja u teškim uvjetima. Kad se bakterija nađe u nepovoljnim životnim uvjetima, prelazi u oblik spore u kojem postoji dok uvjeti ponovno ne postanu povoljni za rast i normalno funkcioniranje.

Česti put prijenosa bakterije ili njenih spora predstavlja kontaminirana hrana, stoga je učinkovita mjera prevencije nekih bakterijskih infekcija propisno i oprezno rukovanje hranom.

Iako antibiotski lijekovi imaju veliku važnost u borbi protiv bolesti, njihova nepotrebno široka upotreba dovela je do pojave rezistencije na antibiotike što značajno kompromitira uspjeh terapijskog liječenja infekcija, povećavajući stope morbititeta i mortaliteta te ekonomski trošak.

Cilj ovog završnog rada je pobliže upoznati bakterijsku vrstu *Clostridium botulinum*, s posebnim naglaskom na njenu rasprostranjenost, kliničku sliku botulizma te strukturalna i biološka obilježja glavnog faktora virulencije – neurotoksina botulina kao potencijalnog agensa bioterorizma.

## 2. RAZRADA TEME

### 2.1. Rod *Clostridium*

Bakterije roda *Clostridium* su anaerobne, gram-pozitivne bakterije često prisutne u prirodnom okruženju. Bakterijske vrste koje pripadaju rodu *Clostridium* imaju sposobnost stvaranja endospora. Oblici endospora razlikuju se od kokoidnih do cilindričnih. S obzirom na to da endospora predstavlja najotporniji poznati tip stanice (rezistentan na toplinu, zračenje, kemikalije, isušivanje), prisutnost spora u hrani ozbiljan je problem. U odgovarajućim uvjetima, spore mogu proklijati i ponovno postati potpuno aktivne stanice.[1]

Bakterijske vrste ovog roda imaju sposobnost fermentacije različitih organskih spojeva, što za posljedicu ima proizvodnju: raznih plinova (metan, vodik, ugljikov (IV) oksid), organskih kiselina (octena, maslačna, fumarna) i otapala (propandiol, butandiol).[2]

## 2.2. Najznačajnije vrste klostridija u humanoj medicini

Rod *Clostridium* sačinjava približno 180 bakterijskih vrsta, što ga ujedno čini jednim od najvećih bakterijskih rodova. Svega nekoliko vrsta unutar ovog bakterijskog roda je patogeno, uključujući one koje proizvode vrlo opasne toksine.[1]

Patogene bakterije roda *Clostridium* imaju štetne učinke na prehrambene proizvode i na zdravlje čovjeka. Njihova patogenost posljedica je proizvodnje egzotoksina. Najpoznatiji proizvođači egzotoksina, odnosno najčešći uzročnici poremećaja zdravlja su: *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium barati*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium septicum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium chauvoei* i *Clostridium difficile*.

Bakterija *C. tetani* obično ulazi u organizam putem rane. Proizvode se toksini koji se krvlju i limfom šire po tijelu. Infekcija ovom bakterijom naziva se tetanus, a karakterističan simptom su konvulzivni grčevi skeletnih mišića.

Infekcije bakterijom *C. sordelli* obično završavaju fatalnim ishodom. Najčešće se javljaju nakon poroda, traume ili rutinskog ginekološkog zahvata.

*C. difficile* uzrokuje infekcije povezane s hranom. Patogeni sojevi proizvode dva proteinska toksina, citotoksin i eneterotoksin koji izaziva proljev.

Vrsta *C. perfringens* uzročnik je plinske gangrene. U razvoju plinske gangrene, uključene su i vrste *C. novyi* i *C. septicum*.

Iako se *Clostridium* kao rod generalno smatra patogenim, važno je shvaćanje mnogih korisnih svojstava koja rod čine upotrebljivim u kemijske, medicinske, kao i kozmetičke svrhe.[2]

Mnogobrojne vrste roda *Clostridium* koriste se u različite biotehnološke svrhe (npr. u proizvodnji enzima). Spore *C. butyricum* upotrebljavaju se kao probiotici, kao tretman protiv dijareje povezane s antimikrobnim lijekovima te kao profilaksa *C. difficile*. U tijeku su istraživanja i testiranja rekombinantnih spora kao antitumorskih sredstava. Takve spore kličaju samo u tkivima u kojima se nalazi niski udio kisika, odnosno tumorskim tkivima omogućavajući tako ciljanje i izravno ubijanje tumorskih stanica. Uobičajeno, tkiva sisavaca imaju visoku zasićenost kisikom, stoga se spore iz zdravih tkiva mogu ukloniti brzo i bez štetnih posljedica.[1]

Toksini proizvedeni od strane bakterija roda *Clostridium* proteinski su kompleksi visoke molekulske mase (oko 150 kD). Slične su konstrukcije, ali su antigenski različiti. Sastoje se od teškog lanca koji je disulfidnom vezom povezan s lakim lancem.

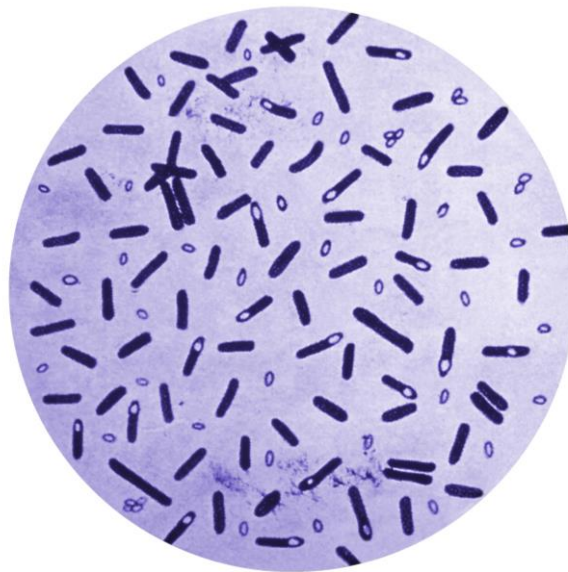
Nakon što je razjašnjen mehanizam djelovanja botulinskog neurotoksina (toksin bakterije *C. botulinum*), omogućeno je njegovo korištenje za široki spektar zdravstvenih poremećaja.[2]

## 2.3. Morfološka obilježja vrste *Clostridium botulinum*

Vrsta *C. botulinum* dijeli se u sedam različitih skupina na osnovu serološkog tipa toksina kojeg jedinka proizvodi. Toksini se razlikuju antigenski, ali su farmakološki sličnog djelovanja.

### 2.3.1. Mikromorfologija

*C. botulinum* karakterizira se kao striktno anaerobna vrsta. To je tanki gram-pozitivni bacil duljine oko 5  $\mu\text{m}$  i širine oko 1  $\mu\text{m}$ . Stanice nemaju kapsulu, a pokreću se pomoću peritrihalnih bičeva. Spore koje proizvodi *C. botulinum* su ispučene, ovalnog oblika i smještene supterminalno u stanici. Spore imaju otpornost na zračenje i temperaturu. Mogu preživjeti nekoliko sati na 100° C i do 10 minuta na temperaturi od 120° C.[3]



**Slika 1.** Mikromorfologija *C. botulinum* i bakterijskih endospora

(Izvor: [https://phil.cdc.gov/PHIL/Images/2107/2107\\_lores.jpg](https://phil.cdc.gov/PHIL/Images/2107/2107_lores.jpg), pristupljeno 10.9.2022.)

### 2.3.2. Kolonijalna morfologija

Optimalna temperatura za rast bakterijske kulture *C. botulinum* je 35° C, ali neki sojevi pokazuju rast i pri temperaturi od 1 do 5° C. Kolonije su velike, poluprozirne i nepravilne s vlaknastim rubovima.

Na konjskom krvnom agaru, svi sojevi osim onih koji pripadaju tipu G su  $\beta$ -hemolitični. Na agaru žumanjka, sojevi osim G-tipa sojeva imaju biserni efekt i proizvode opalescenciju.[3]



**Slika 2.** Kolonijalna morfologija *C. botulinum* na agaru žumanjka

(Izvor: <https://paramedicsworld.com/wp-content/uploads/2018/05/clostridium-botulinum-on-egg-yolk-agar-medium-clostridium-botulinum-on-egg-yolk-medium-c.-botulinum-on-egg-yolk-agar-medium.jpg>, pristupljeno 10.9.2022.)

## 2.4. Uzgoj i rasprostranjenost *C. botulinum*

Za rast bakterije *C. botulinum* potrebni su strogo anaerobni uvjeti, što predstavlja izazovan zadatak u laboratorijskom radu. Svi mediji za uzgoj kulture prolaze deoksigenaciju grijanjem u kipućoj vodenoj kupelji ili protjecanjem smjese anaerobnih plinova. U medij se mogu dodati i reducirajuće tvari (npr. tioglikolat) s ciljem održavanja anaerobnih uvjeta tijekom nanošenja uzorka i tijekom inkubacije. Sav stakleni i plastični pribor koji se koristi tijekom uzgoja također je potrebno deoksigenirati.

Za uzgoj bakterijske kulture koriste se različiti hranjivi mediji koji sadrže kombinacije hranjiva poput triptona, peptona, glukoze, tripsina i kvasca. Takvi su mediji neselektivni pa omogućuju rast i mnogih drugih bakterija. Najčešći mediji koji se upotrebljavaju su krvni agar i žumanjčani agar. Žumanjčani agar omogućava reakciju enzima lipaze koja je tipična za *C. botulinum*. Ipak, neke druge vrste roda *Clostridium* također proizvode lipazu, stoga može doći do konfuzije u identifikaciji. Kad se agar žumanjka dopuni cikloserinom, sulfametoksazolom i trimetoprimom, dobije se medij selektivan za određene sojeve *C. botulinum*. S obzirom na to da takav medij može inhibirati rast nekih drugih sojeva, njegovo korištenje je ograničeno.

Unutar vrste *C. botulinum* postoje sojevi različitih fiziologija, što utječe na optimalnu temperaturu inkubacije. Sojevi jedne skupine optimalan rast pokazuju pri temperaturi od 35 do 37° C, dok sojevi druge skupine imaju nižu optimalnu temperaturu rasta, od 25 do 30° C. Stoga, ako se iz istog uzorka uzgajaju obje skupine sojeva, temperatura inkubacije bit će kompromisno određena.[4]

*C. botulinum* je, poput ostalih predstavnika iz roda *Clostridium*, široko rasprostranjena. Obično se nalazi u tlu, vodenom okolišu, poput sedimenta morske i riječne vode, te probavnom traktu riba, ptica i sisavaca. Zbog mogućnosti stvaranja spora, može preživjeti u teškim uvjetima dugi period. Prirodni med identificiran je kao izvor spora *C. botulinum*. [5]

## 2.5. Klinička slika botulizma

Botulizam je rijetko, ali potencijalno smrtonosno stanje difuzne, mlohave paralize mišića. Uzrok botulizma je botulinski neurotoksin kojeg proizvodi vrsta *C. botulinum*. Paraliza je posljedica nepovratne inhibicije otpuštanja acetilkolina u sinaptičku pukotinu tjelesnih živčano-mišićnih spojeva. Od prepoznavanja botulizma kao bolesti koja se prenosi hranom, opisano je još nekoliko tipova botulizma uključujući botulizam dojenčadi, botulizam rana i jatrogeni botulizam (botulizam uzrokovan liječenjem).[6]

Izlaganje botulinskom neurotoksinu može se dogoditi:

- gutanjem (uzimanjem hrane) – botulizam koji se prenosi hranom
- bakterijskom kolonizacijom crijeva – botulizam dojenčadi / botulizam crijevne kolonizacije odraslih
- bakterijskom kolonizacijom rane – botulizam rane
- terapijskim ili kozmetičkim injekcijama – jatrogeni botulizam
- udisanjem – inhalacijski botulizam[7]

Početak stanja je paraliza kranijalnih živaca koja se širi i prelazi u simetričnu slabost udova i trupa do konačne mlohave paralize. Bolesnici uobičajeno nemaju poremećaje osjetila osim zamućenog vida. Karakteristični rani simptomi uključuju smetnje vida, otežano gutanje, promjenu glasa i nejasan govor. Zahvaćenost ošita ubrzava zatajenje dišnog sustava, što često zahtijeva intubaciju i mehaničku ventilaciju. Paraliza glatkih autonomnih mišića uzrokuje zadržavanje urina i opstipaciju.

Botulizam koji se prenosi hranom često se pojavljuje uz jaku bol abdomena, mučninu i povraćanje od 12 do 72 sata nakon unošenja toksina u organizam.

Botulizam dojenčadi kombinacija je infekcije i intoksikacije. Uključuje oralni unos spora, klijanje u probavnom sustavu i *in vivo* proizvodnju toksina.[2] Ispoljavanje i ozbiljnost botulizma dojenčadi razlikuje se ovisno o količini toksina, osjetljivosti organizma domaćina i vremenu koje je potrebno da se razvije botulizam. Rani simptomi najčešće uzrokuju opstipaciju, slabost, otežano hranjenje, slinjenje i slabi plač.[6]



Botulizam crijevne kolonizacije kod odraslih uključuje kolonizaciju debelog crijeva bakterijom i apsorpciju toksina (proizvedenog *in vivo*) u krv. Do kolonizacije crijeva bakterijom može doći zbog poremećenog sastava bakterijske flore, stanja nakon kirurške operacije ili upale crijeva.[2]

Nehigijensko ubrizgavanje jedne vrste heroina najčešći je uzrok onečišćenja rane bakterijom i naknadne proizvodnje toksina. Botulizam rana kod pacijenata izaziva simptome vezane uz produženu moždinu i celulitis, a jedina je vrsta botulizma kod koje se očituje pojava simptoma infekcije.[6]

Jatrogeni je botulizam izuzetno rijedak, a uzrokuje ga botulinski neurotoksin tipa A injekcijom unesen u organizam.[2]

S obzirom na to da se terapija treba započeti što je ranije moguće, liječenje se često započinje na osnovu sumnje jer je laboratorijska potvrda botulizma proces dug nekoliko dana. Analizom seruma i stolice na botulinski toksin, dobije se laboratorijska potvrda botulizma.

Klinički tijek botulizma može ublažiti primjena polivalentnog antitoksina, ali pravi protuotrov ne postoji. Liječenje botulizma oslanja se na razne terapije i mehaničke ventilacije čijom dugotrajnom primjenom dolazi do oporavka neuromuskularnih signalnih mehanizama.

Smrtnost uzrokovana botulizmom je niska. Prije 1950-ih godina, stope smrtnosti od botulizma uzrokovanog hranom bile su između 60 i 70%. Danas, stopa smrtnosti neusporedivo je manja, a najveću smrtnost uzrokuje botulizam nepoznatog ili neutvrđenog podrijetla.

Najvažnije mjere prevencije botulizma su pravilni načini rukovanja hranom. Bitan je oprez i propisno prokuhavanje te skladištenje u kućnom konzerviranju hrane. Izbjegavanje meda za dojenčad mlađu od godinu dana najbolji je način prevencije botulizma dojenčadi.[6]

## 2.6. Faktori virulencije

Faktori virulencije (bakterijski toksini i proteini stanične površine) genski su produkti koji patogenom organizmu omogućavaju da se smjesti na površinu ili unutar domaćina pružajući vjerojatnost izazivanja bolesti.

Botulinski toksin primaran je faktor virulencije *C. botulinum*. Bakterija koristi botulinski toksin za brzo ubijanje i saprofitsko iskorištavanje, ne provodeći dugo razdoblje povezana sa živim domaćinom. Uz to, određena skupina sojeva sadrži dva adherencijska proteina i tri gena za kodiranje toksina.

Nisu svi faktori virulencije prijatniji za čovjeka. Neki od faktora virulentni su samo prema drugim bakterijama. Uzroci proizvodnje faktora virulencije nisu literaturno dokazani.[8]

## 2.7. Botulinski neurotoksin

Bakterija *C. botulinum* proizvodi proteinski botulinski neurotoksin. Neurotoksin uzrokuje paralizu blokiranjem otpuštanja neurotransmitera na živčanim završecima.

Botulinski neurotoksini klasificirani su u sedam seroloških tipova i označavaju se abecednim slovima od A do G. Novije genske analize, uključujući tehnike sekvenciranja nove generacije, dovode do otkrića gena koji kodiraju mnoge botulinske toksine. Novootkriveni toksini mogu se svrstati unutar postojećih serotipova, ali ih karakteriziraju različiti sljedovi aminokiselina. Nije objašnjen biološki značaj rastućeg broja botulinskih neurotoksina.

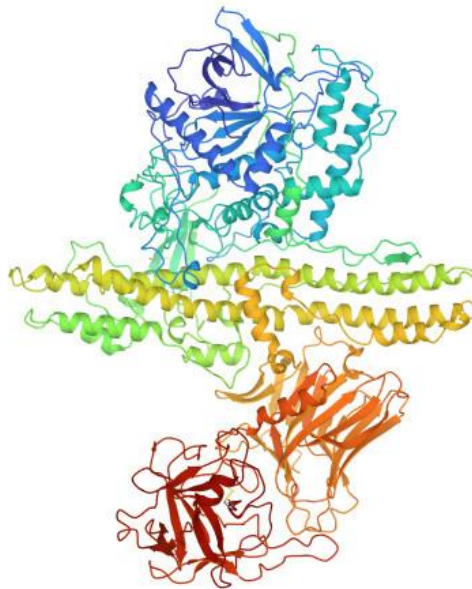
U molekuli botulinskog neurotoksina spaja se nekoliko povoljnih farmakoloških svojstava, što čini takve toksine jedinstvenim lijekovima. Botulinski toksini su vrlo potentni i specifični, a djelovanje im je vremenom reverzibilno. Takva farmakološka svojstva čine učinkovitu terapiju za različite ljudske sindrome koje opisuje povećana funkcija živčanih završetaka. Klinička primjena botulinskih neurotoksina, od uvođenja u terapiju ljudi, kontinuirano se širi, a najširu i najčešću primjenu ima u kozmetičkim tretmanima.

Geni koji kodiraju botulinske neurotoksine nalaze se unutar kromosomske DNA ili unutar plazmida. Gen za botulinski neurotoksin uvijek je smješten pored gena koji kodira netoksični nehemaglutinin (NTNHA). Protein NTNHA ima značajne sličnosti s botulinskim toksinima tipa A i tipa B. Protein NTNHA s botulinskim neurotoksinom tvori heterodimer koji oblikom podsjeća na ruku u ruci. Takva struktura dovodi do zaključka da protein NTNHA štiti molekulu neurotoksina od proteolitičkih utjecaja. Ovakva zaštita od iznimne je važnosti jer heterodimer uglavnom prolazi kroz gastrointestinalni trakt, područje bogato proteazama.[9]

### 2.7.1. Struktura

Svi botulinski neurotoksini imaju sličnu molekularnu građu bez obzira na imunološke razlike i razlike u slijedu aminokiselina. Zreli, farmakološki aktivan toksin sastavljen je od lakog lanca (50 kDa) i teškog lanca (100 kDa) povezanih disulfidnom vezom, nekovalentnim interakcijama i posebnim segmentom koji se sastoji od N-kraja teškog lanca koji okružuje globularnu domenu lakog lanca. Teški se lanac sastoji od dvije domene po 50 kDa.

Laki lanac je metaloproteaza, a njeno aktivno mjesto nalazi se ukopano unutar jezgre strukture. Otkriće da je botulinski neurotoksin metaloproteaza s vezanim atomom  $Zn^{2+}$ , ubrzo dovodi do identifikacije supstrata, tri SNARE proteina. Tim se proteinima cijepa peptidna veza unutar citosolnih domena.[9]



**Slika 3.** Kristalna struktura botulinskog toksina serotipa A

(Izvor: <https://www.rcsb.org/structure/3BTA>, pristupljeno 12.9.2022.)

## 2.7.2. Djelovanje

Botulinski su toksini klasičan primjer bakterijskih egzotoksina kojima je cilj unutarstanični supstrat. Takvi su toksini razvili organizaciju strukture dizajniranu za isporuku metaloproteazne domene unutar citosola domaćina.

Mehanizam intoksikacije završetka živaca dijeli se u pet osnovnih koraka:

1. visokoafinitetno vezanje za živčane završetke
2. stapanje unutar endocitnog odjeljka
3. premještanje lakog lanca pomoću vezikule
4. otpuštanje lakog lanca u citosolu redukcijom disulfidne veze između lakog i teškog lanca
5. cijepanje SNARE proteina

Posljedica cijepanja SNARE proteina je blokiranje otpuštanja neurotransmitera, što dovodi do neuromparalaze.

Drugi bakterijski i biljni toksini ubijaju stanice, ali botulinski neurotoksin se razlikuje zbog potpune reverzibilnosti neuromparalaze koju izaziva. Zahvaljujući reverzibilnosti, pacijent s botulizmom može preživjeti i tešku intoksikaciju pod uvjetom da mu je pružena potrebna njega. Botulinski neurotoksini nisu citotoksični i ne uzrokuju degeneraciju aksona, što je razlog zabilježenih slučajeva u kojima su pacijenti preživjeli botulizam nakon više mjeseci provedenih u hitnoj medicinskoj službi.

Paraliza izazvana botulinskim toksinom tipa A otkriva se nakon 2 do 3 dana od injektiranja, a maksimalnu vrijednost doseže unutar 1 do 2 tjedna. Maksimalna razina paralaze održava se određeno vrijeme ovisno o mjestu primjene, a zatim opada.[9]

### 2.7.3. Primjena

Terapeutski je potencijal botulina otkriven 70-ih godina prošlog stoljeća tijekom liječenja strabizma kod majmuna ubrizgavanjem toksina u kružne očne mišiće. Neposredno po odobrenju upotrebe u terapijske svrhe, spektar primjene botulinskog neurotoksina se proširio i još uvijek se širi.

U terapijske se svrhe zasad koriste samo botulinski neurotoksini seroloških tipova A1 i B1. Procjena djelotvornosti botulinskih toksina kao terapeutika kompleksan je zadatak i zahtijeva mnoga klinička istraživanja i njihove usporedbe. Nakon istraživanja provedenih u oftalmologiji, botulinski su toksini ušli u neurološku terapiju.[9]

Trenutno postoje tri pripravka botulinskog neurotoksina tipa A dostupna na svjetskoj razini, a nalaze se pod zaštićenim imenima: Dysport®, Botox® i Xeomin®.[10]

Primarna svrha bila je ublažavanje povećane kontrakcije malih mišića kapaka i lica i većih mišića glave i vrata. Lokalne injekcije botulinskih neurotoksina ublažavaju simptome distonija, skupine poremećaja koju karakteriziraju dugotrajne, nevoljne kontrakcije mišića. Rezultat terapijskog korištenja botulinskog neurotoksina kod distonija rezultat je smanjenog otpuštanja acetilkolina u neuromuskularni spoj i posljedičnog opuštanja zahvaćenih mišića.

S obzirom na to da botulinski neurotoksini ne utječu samo na skeletni živčano-mišićni prijenos već i na autonomnu inervaciju, njihova upotreba ima utjecaj na poremećaje autonomnog živčanog sustava. Botulinski neurotoksini tako imaju učinak kod hipersekretornih poremećaja poput hiperhidroze, kao i kod hiperaktivnosti glatkih mišića, odnosno uroloških i gastrointestinalnih poremećaja.

Iako je trenutno dostupan veliki broj analgetika, izazov i dalje predstavlja liječenje kronične boli. Liječenje botulinskim neurotoksinima pokazalo je djelotvornost za široki spektar bolnih poremećaja ljudi. Također, učinkovitost je dokazana i u liječenju kronične boli koja je otporna na druge tretmane.

Postoje dokazi o učinku u liječenju depresije nakon injekcije botulinskog neurotoksina tipa A1 u mišiće čela. Poboljšanje raspoloženja pacijenata objašnjeno je povezanošću izraza lica s emocionalnom percepcijom. Neutralizacijom mrštenja, toksin poboljšava percepciju pacijenta.

Otpriblike polovica botulinskog neurotoksina tipa A1 proizvedenog medicinski koristi se u estetskoj medicini. Slučajno zapažen učinak na bore lica dovodi do opsežnog proučavanja učinka toksina na glabelarne bore. Glabelarne bore shvaćaju se kao znak starenja i negativnih emocija. Aktivnost određenih mišića lica i ponavljajuća kontrakcija odgovorne su za glabelarne bore.[9]

Indikacije botulinskog neurotoksina za estetsku primjenu uključuju glabelarne bore, horizontalne bore na čelu, horizontalne bore na vratu, namrštene usne itd.

Sebum ima ulogu u opskrbi površine kože hidrofobnim antioksidativnim tvarima i ima antibakterijska svojstva pa djeluje kao kožna barijera. Višak sebuma zatvara pore i može uzrokovati kožne upale (npr. seboroični dermatitis, akne). Testirana je sigurnost i učinkovitost botulinskog toksina za korištenje protiv prevelike količine sebuma. Svim ispitanicima, ubrizgan je toksin u deset točaka na čelu i kod svih je rezultat značajno smanjenje proizvodnje sebuma. Proizvodnja sebuma vratila se nakon 16 tjedana na normalnu razinu. Mehanizam djelovanja botulinskog toksina na proizvodnju sebuma nije potpuno poznat zbog toga što utjecaj acetilkolina na lojne žlijezde nije u cijelosti opisan.

Antiinflamatorni učinak botulinskog neurotoksina, kao i utjecaj na žilni sustav kože, smanjuju upalu procesa zacjeljivanja rane, što pomaže u sprečavanju nastanka ožiljaka. Botulinski neurotoksin gotovo potpuno uklanja mišićno naprezanje na rani koja zacjeljuje inhibirajući otpuštanje acetilkolina.

Botulinski neurotoksin ima pozitivan učinak na percepciju, raspoloženje i samopouzdanje pacijenata. Pacijenti su potvrđivali poboljšanje privlačnosti lica i posljedično bolje psihološko stanje čak i nakon 120 dana od ubrizgavanja kad se klinički učinci smanjuju.[11]

Liječenje botulinskim neurotoksinom među najzahvalnijim je medicinskim zahvatima po pitanju ishoda. Kako bi se spriječile slučajne komplikacije, važno je poznavanje točki ubrizgavanja. Također, kako bi se postigli optimalni rezultati, potrebno je paziti na ispravnu dozu i dubinu injektiranja. Ponekad se toksin ubrizgava i u skupinu antagonističkih mišića da bi se održao sklad i preduhitrla hiperaktivnost mišića antagonista.[12]

Pokazano je da je dugotrajna primjena botulinskih toksina u terapiji izrazito sigurna kada ju primjenjuju ovlaštene medicinske djelatnici koristeći ispitane, licencirane pripravke. U protivnom, korištenje toksina od strane nekvalificiranih osoba ili upotreba neodobrenih preparata može dovesti pacijenta u opasnost.

Kontraindikacije za terapijsku upotrebu botulinskog neurotoksina su inficirano mjesto ubrizgavanja ili hipersenzibilnost na toksin.

Realno je očekivati da će primjena i dalje napredovati otkrivanjem i analizom novih botulinskih toksina.



#### 2.7.4. Toksičnost

Botulinski toksini imaju najveću toksičnost među danas poznatim toksinima. Toksičnosti pridonosi njihova neurospecifičnost, enzimski karakter N-kraja i SNARE proteini kao supstrat. Toksikološka ispitivanja botulinskih toksina komplicirana su i zahtjevna iz više razloga. U ispitivanjima se koriste pripravci različite čistoće i skladištenja. Također, SNARE proteini mogu imati više formi i razlikuju se od organizma do organizma. Važno je imati na umu i da se botulizam drugačije podnosi u kavezu pri kontroliranim uvjetima nego u divljini. Stoga, doza injektirana životinji u kavezu izazvat će tek početne simptome, dok će životinju u divljini vrlo vjerojatno ubiti zbog zakazivanja fizičkih funkcija koje su u divljini neophodne za opstanak. Kod ljudi, toksičnost nije poznata, ali se može odrediti ekstrapolacijom podataka od toksičnosti kod majmunskih vrsta.

Toksičnost botulinskih toksina koji se unesu oralno je manja. Razlog tome je put koji toksin prolazi prije apsorpcije, odnosno regije bogate proteazama i kiselinama. Dokazano je da protein NTNHA štiti veliki dio molekule botulinskog neurotoksina od napada proteaza i drugih reaktivnih molekula. Pomoćni proteini nemaju utjecaja na toksičnost toksina ubrizganog intravenskim ili intramuskularnim putem zbog disocijacije pri neutralnoj pH vrijednosti tako da ne utječu na djelovanje toksina u različitim terapijskim ili kozmetičkim komercijalno dostupnim pripravcima.[9]

Jačina pripravaka botulinskog toksina tipa A1 izražava se u jedinicama (U), a jedna U odgovara vrijednosti LD50 (količina toksina primijenjena odjednom koja izaziva smrt polovine testiranih jedinki) na miševima. Injektirana doza kod ljudi varira od 20 do 800 U, ovisno u koju se svrhu primjenjuje. Jedna U lijeka na bazi botulinskog toksina odgovara količini od nekoliko pikograma toksina, stoga se može zaključiti da je čak i najveća količina koja se klinički koristi 20-ak puta niža od intramuskularne vrijednosti LD50.[13]

### 2.7.5. Prijetnja bioterorizma

Bioterorizam uključuje namjerno onečišćenje hrane ili pića toksinom ili aerosolizaciju toksina. Pročišćeni botulinski toksin proizveden od strane vojnih programa za biološko ratovanje različitih zemalja, mogao bi biti raspršen u obliku aerosola i tako izazvati inhalacijski botulizam. Takav oblik botulizma ne javlja se prirodno, a mogao bi pogoditi veliki broj osoba.[7]

Botulinski je toksin bio jedan od prvih tvari razmatranih u svrhu biološkog oružja. Drugi svjetski rat ključno je razdoblje za prve pokušaje pretvaranja ovog toksina u biološko oružje. Godine 1943., njemački su znanstvenici razmatrali ubrizgavanje botulinskog toksina u hranu ili u pastu za zube. Njemački vođa Himmler ovlastio je laboratorije za istraživanja bakteriološkog ratovanja uz poticanje pokusa na zatvorenicima u koncentracijskim logorima. Ipak, ako se u obzir uzme sva razmatranja botulinskog toksina kao biološkog oružja, čitav njemački program je beznačajan. Nacistička Njemačka nije posjedovala botulinski toksin kao dio vojnog arsenala za vrijeme Drugog svjetskog rata. Također, nije pokrenuto aktivno istraživanje botulinskog toksina u svrhe biološkog oružja.[14]

Iako i dalje postoji određena doza zabrinutosti zbog bioterorizma, potencijal botulinskog toksina kao bioterorističkog oružja je ograničen i znatno niži nego kod pojedinih virusa ili spora bakterije *Bacillus anthracis*. [9]

### 3. ZAKLJUČAK

Bakterijski rod *Clostridium* obuhvaća oko 180 anaerobnih, gram-pozitivnih bakterijskih vrsta. Bakterije ovog roda široko su rasprostranjene u prirodnom okruženju. Sposobne su stvarati otporne endospore i tako predstavljaju problem uzrokujući štetne učinke na organizam. S druge strane, u ovaj rod spadaju i vrste koje danas imaju primjenu u medicinske ili industrijske svrhe. Jedna od glavnih patogena roda je vrsta *C. botulinum*.

*C. botulinum* tanki je bacil koji se može naći u tlu, vodenim okolišima i probavnom traktu viših životinja te čovjeka. Poput ostalih srodnika iz roda, obvezatni je anaerob. Nema kapsulu, a pokreće se peritrihalnim bičevima. Proizvodi neurotoksin koji uz proteine stanične površine predstavlja faktore virulencije.

Botulinski neurotoksin najotrovniji je poznati toksin. Postoje različiti serološki tipovi botulinskog neurotoksina, a označavaju se slovima od A do G. Botulinski se neurotoksini (tipovi A1 i B1) koriste u terapijske svrhe, za ublažavanje stanja okarakteriziranih hiperaktivnošću mišića te za liječenje određene kronične boli. Također, botulinski toksini imaju široku primjenu u kozmetologiji nakon što se slučajno otkrio utjecaj na bore lica i vrata, odnosno njihovo smanjenje.

Loša strana botulinskog neurotoksina je uzrokovanje botulizma, rijetkog, ali po život opasnog stanja. Botulizam je stanje paralize koje se može razviti izlaganjem toksinu oralnim unosom, udisanjem, injekcijama, kontaminacijom rana ili kao posljedica bakterijske kolonizacije crijeva. Djelovanje botulinskog neurotoksina potpuno je reverzibilno, stoga i oporavak od botulizma može biti potpun uz odgovarajuću medicinsku skrb.

Još jedna opasnost nalazi se u potencijalnom korištenju botulinskog neurotoksina kao bioterorističkog oružja. Pročišćeni toksin u takve bi se svrhe mogao aerosolizirati i istovremeno uzrokovati intoksikaciju velikog broja osoba.

## 4. LITERATURA

- [1] Dürre P. Physiology and Sporulation in Clostridium. *Microbiology Spectrum*. 2014;2(4). doi: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0010-2012>
- [2] Samul D, Worsztynowicz P, Leja K, Grajek W. Beneficial and harmful roles of bacteria from the Clostridium genus. *Acta Biochimica Polonica*. 2013;60(4). PMID: 24432307
- [3] Kumar S. *Essentials of Microbiology*. Jaypee Brothers Medical Publishers, 2015.
- [4] Lindström M, Korkeala H. Laboratory Diagnostics of Botulism. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006;19(2). doi: <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.298-314.2006>
- [5] Abdolmohammadi Khiav L, Zahmatkesh A. Major pathogenic *Clostridia* in human and progress to clostridial vaccines. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2022;25. doi: 10.22038/IJBMS.2022.65518.14417
- [6] Jeffery IA, Karim S. Botulism. StatPearls [Internet]. 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459273/> (pristupljeno 9. 9. 2022.)
- [7] Rao AK, Sobel J, Chatham-Stephens K, Luquez C. Clinical Guidelines for Diagnosis and Treatment of Botulism. *MMWR Recommendations and Reports*. 2021;70(2) doi: 10.15585/mmwr.rr7002a1
- [8] Chellapandi P, Prisilla A. *Clostridium botulinum* type A-virulome-gut interactions: A systems biology insight. *Human Microbiome Journal*. 2018;7-8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.humic.2018.01.003>
- [9] Pirazzini M, Rossetto O, Eleopra R, Montecucco C. Botulinum Neurotoxins: Biology, Pharmacology, and Toxicology. *Pharmacological Reviews*. 2017;69(2). doi: 10.1124/pr.116.012658
- [10] Field M, Splevins A, Picaut P, van der Schans M, Langenberg J, Noort D, Snyder D, Foster K. AbobotulinumtoxinA (Dysport<sup>®</sup>), OnabotulinumtoxinA (Botox<sup>®</sup>), and IncobotulinumtoxinA (Xeomin<sup>®</sup>) Neurotoxin Content and Potential Implications for Duration of Response in Patients. *Toxins (Basel)*. 2018;10(12). doi: 10.3390/toxins10120535
- [11] Naik PP. Utilities of Botulinum Toxins in Dermatology and Cosmetology. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*. 2021;14. doi: <https://doi.org/10.2147/CCID.S332247>
- [12] Arora G, Arora S. Where and how to use botulinum toxin on the face and neck – Indications and techniques. *CosmoDerma*. 2021;1. doi: 10.25259/CSDM\_16\_2021
- [13] Rossetto O, Montecucco C. Tables of Toxicity of Botulinum and Tetanus Neurotoxins. *Toxins (Basel)*. 2019;11(12). doi: 10.3390/toxins11120686
- [14] Tatu L, Feugeas JP. Botulinum Toxin in WW2 German and Allied Armies: Failures and Myths of Weaponization. *European Neurology*. 2021;84. doi: 10.1159/000512812