

# Botoks kao otrov i lijek - mehanizam djelovanja neurotoksina botulina

---

Srnec, Karla

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:048327>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Karla Srnec

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

**BOTOKS KAO OTROV I LIJEK-  
MEHANIZAM DJELOVANJA  
NEUROTOKSINA BOTULINA**

**Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Zagreb, 2019.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

1. srpnja 2019.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

18. rujna 2019.

Mentor rada: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Potpis:



# Sadržaj

<b>§ SAŽETAK.....</b>	<b>VII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Organizacija živčanog sustava .....</b>	<b>3</b>
2.1.1. Podjela živčanog sustava .....	3
2.1.2. Stanična biologija neurona.....	5
2.1.1. Membranski i akcijski potencijal .....	8
2.1.1. Signalne molekule i signalni mehanizmi .....	9
2.1.1. Sinapsa.....	12
<b>2.2. Uloga SNARE-proteina u fuziji membrana.....</b>	<b>16</b>
2.2.1. Stanične membrane i SNARE-proteini.....	16
2.2.2. Fuzija membrana .....	17
2.2.3. Strukturni model SNARE-proteina i njihove interakcije u egzocitozi .....	19
2.2.4. Uloga TMD-a i važnost interakcija između lipida i proteina u fuziji membrana .....	20
2.2.5. Regulatorni proteini u egzocitozi potpomognutoj SNARE-proteinima .....	21
<b>2.3. Mehanizam djelovanja neurotoksina botulina .....</b>	<b>23</b>
2.3.1. Botulinski neurotoksin.....	23
2.3.2. Botulinski neurotoksin selektivno prepoznaje živčane završetke .....	25
2.3.3. Botulinski neurotoksin u tretiranju neuropatske boli.....	29
2.3.4. Botulinski neurotoksin u zatezanju kože .....	30
<b>§ 3. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>XXXI</b>



## § Sažetak

Neurotoksin botulin je toksin kojeg proizvode bakterije roda *Clostridium* i najotrovniji je poznati toksin među svim bakterijskim, životinjskim, biljnim i kemijskim otrovnim spojevima. U tijelu čovjeka izaziva bolest koja je poznata pod nazivom botulizam.

Toksin se najčešće unosi hranom i tako ulazi u probavni sustav čovjeka, međutim, kroz želudac i crijeva čovjeka on prolazi neaktivan i ne uzrokuje nikakve bolesti probavnog sustava. Krvlju i limfom on putuje do perifernog živčanog sustava gdje prepoznaje specifične receptore na ciljnim živčanim stanicama i tamo inhibira izlučivanje neurotransmitera acetilkolina u neuromišićnoj sinapsi.

Inhibicijom neurotransmisije acetilkolina uklanja se komunikacija između živčanih završetaka perifernog živčanog sustava i mišićnih vlakna što vodi paralizi mišićnog tkiva. U slučaju neliječenog botulizma, paraliza mišićnog tkiva će u konačnici zahvatiti mišiće ždrijela i respiratornog sustava i uzrokovati gušenje domaćina.

Djelovanje toksina botulina danas pronalazi primjenu u medicini na način da se lokalno ubrizgavaju jasno definirane doze toksina, koje uzrokuju reverzibilne paralize i tako koriste u liječenju neuropatskih bolova koji su posljedice oštećenja perifernih živaca ili pak nekontroliranih mišićnih spazama.

Toksin također pronalazi primjenu u industriji ljepote gdje se najčešće koristi za zatezanje kože lica i vrata gdje se također primjenjuje lokalno.



## § 1. UVOD

Za aktivaciju mišića, mozak šalje električni impuls duž živčanih stanica, gdje se on na mišićne stanice prenosi na mjestu njihovog spajanja – neuromišićne sinapse. Kad živčani impuls stigne do neurona, uzrokuje depolarizaciju živčane stanice zbog čega se otvaraju kanali za  $\text{Ca}^{2+}$  i povećanje njegove koncentracije u citosolu neurona je signal za započinjanje egzocitoze neurotransmitera iz sinaptičkih vezikula. Razlog tome je činjenica da se  $\text{Ca}^{2+}$  veže za protein sinaptotagmin (protein u membrani sinaptičke vezikule), čija konformacija se u tom slučaju značajno promijeni, veže se za sintaksin (protein u membrani ciljne plazmatske membrane) i ostale proteine 'fuzijskog stroja' i omogućuje fuziju membrane sinaptičke vezikule i plazmatske membrane. Taj proces je od ključne važnosti jer omogućuje izlučivanje neurotransmitera acetilkolina iz neurona u sinaptičku pukotinu, čime se signal prenosi na druge stanice, u ovom slučaju mišićne. Na taj način se generira odgovor tijela na vanjske i unutarnje podražaje.

SNARE-kompleks je proteinski kompleks kojeg formiraju proteini na membranama sinaptičkih vezikula i na plazmatskoj membrani. Taj kompleks je ključan za fuziju dviju membrana.

Cilj ovog rada jest proučiti mehanizam kojim botulinski neurotoksin inhibira neurotransmisiju acetilkolina u neuromišićnoj sinapsi i time dovodi do paralize mišićnog tkiva.

U slučaju zaraze toksinom botulina, jednom kad krvlju dođe do živčanih završetaka, veže se za receptor na površini presinaptičke membrane i procesom recikliranja sinaptičkih vezikula ulazi u presinaptički neuron. U sinaptičkoj vezikuli unutar neurona se toksin cijepa na teški i laki lanac, gdje je laki lanac aktivni dio neurotoksina. Oslobođanjem lakog lanca toksina u citosol neurona, on cijepa jednu od tri vrsta SNARE-proteina: SNAP-25, sinaptobrevin ili sintaksin. Cijepanjem tih proteina onemogućuje se fuzija sinaptičkih vezikula ispunjenih acetilkolinom i plazmatske membrane neurona, što ima za posljedicu paralizu mišićnog tkiva.

Kao što je poznato, razlika između otrova i lijeka je u dozi. To je načelo koje svakako vrijedi u slučaju botulina. Njegovo svojstvo uzrokovanja reverzibilne paralize pronalazi svoju primjenu u tretiranju raznih stanja čovjeka, međutim njegovo djelovanje u tim slučajevima je uvijek lokalno. U slučaju krive procjene od strane liječnika i ubrizgavanja prevelike doze botulina, on može uzrokovati ozbiljne posljedice na zdravlje čovjeka, a u konačnici i smrt.<sup>16,18</sup>

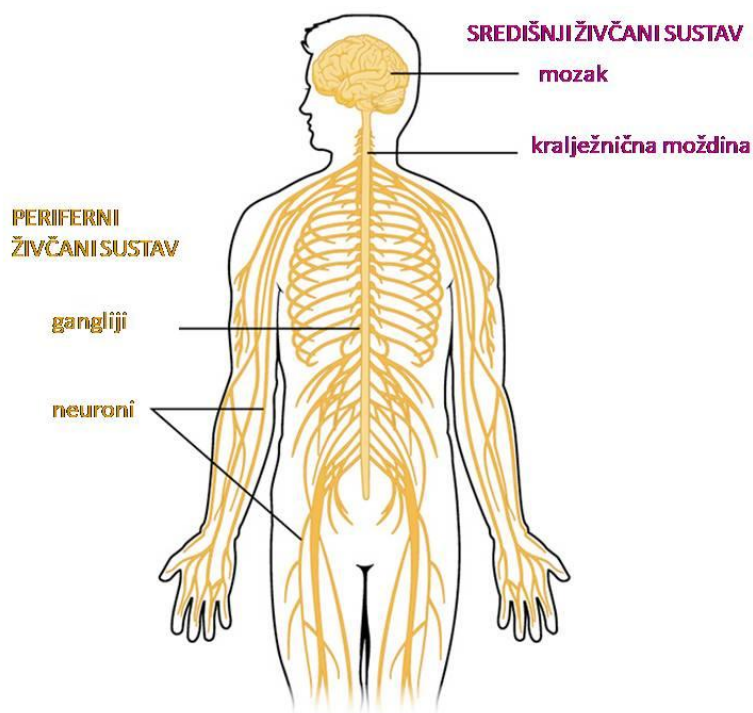
## § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

### 2.1. Organizacija živčanog sustava

#### 2.1.1. Podjela živčanog sustava

Živčani sustav je jedan od jedanaest organskih sustava u tijelu čovjeka čija je funkcija odašiljanje signala od jedne stanice ili dijela tijela, do drugog. Cijeli živčani sustav je podijeljen na središnji živčani sustav, kojeg sačinjavaju mozak i kralježnična moždina, te periferni, kojeg sačinjavaju živčane stanice – neuroni, kao i njihove nakupine – gangliji.

Središnji i periferni živčani sustav spojeni su na 2 načina izravno: kralježničnu moždinu sa ostatkom tijela povezuje 31 par moždinskih živaca, a mozak s ostatkom tijela povezuje 12 pari moždanih živaca. Moždinski živci prolaze kroz otvore između kralježaka, a moždani živci prolaze kroz otvore koji su uglavnom smješteni na bazi lubanje.

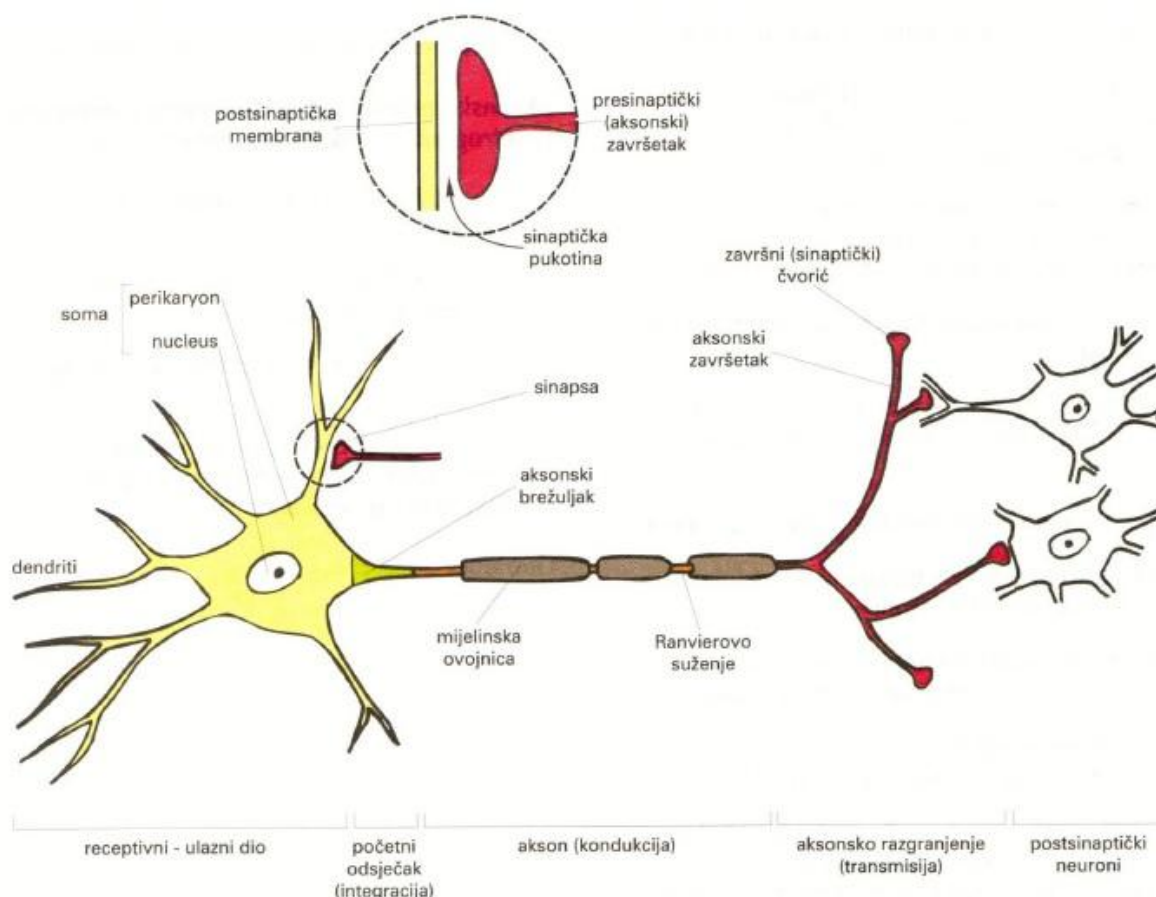


Slika 1. Podjela živčanog sustava čovjeka na: središnji živčani sustav (kojeg sačinjavaju mozak i kralježnična moždina) i periferni živčani sustav (kojeg sačinjavaju neuroni i nakupine neurona-gangliji). (Preuzeto iz <sup>2)</sup>)

Kao što je spomenuto, uloga živčanog sustava je da prenosi signal u tijelu, što je postignuto pomoću neurona, koji su osnovna strukturna i funkcionalna jedinica cijelog živčanog sustava. Karakteristika odraslih i zrelih neurona u živčanom sustavu čovjeka je da su terminalno diferencirani, što znači da se nikad ne dijele.

Osim neurona, postoji i druga temeljna vrsta stanica u živčanom sustavu, a to su glije, potporne stanice koje omogućuju homeostazu, te podršku i zaštitu neuronima.

Neuroni su ti koji stvaraju, primaju i provode živčani impuls uzrokovan podražajem unutar ili izvan organizma. Naziv neuron se odnosi na cijelu živčanu stanicu, koja je podijeljena na četiri dijela: trup (*soma*), iz kojeg izlaze dvije vrste staničnih nastavaka -akson i jedan ili više dendrita, te presinaptički završeci aksona. Potonji stupaju u izravni dodir sa specijaliziranim dijelovima membrana drugih (postsinaptičkih) neurona ili drugih ciljanih stanica, npr. mišićnih stanica. Na taj način nastaju sinapse, glavno mjesto interakcije između neurona koje služi prijenosu signala.<sup>1</sup>



Slika 2. Idealizirani prikaz neurona. Strukturno-funkcionalna podjela neurona na receptivni (soma i dendriti), integracijski (aksonski brežuljak i početni odsječak), kondukcijski (akson) i transmisijski (presinaptički aksonski završetak) dio. (Preuzeto iz <sup>3</sup>)

Za razliku od aksona, glije ne stvaraju akcijske potencijale i mogu se dijeliti cijelog života. I u središnjem i u perifernom živčanom sustavu postoje specijalizirani oblici glija, primjer takvih u perifernom živčanom sustavu su Schwannove stanice (izgrađuju mijelinske ovojnice perifernih aksona) i satelitne stanice (ovijaju tijela neurona u osjetnim i autonomnim ganglijima). Neke od ostalih funkcija specijaliziranih glija su: makrofagi mozga (aktiviraju se u fagocite tijekom upalne ili degenerativne bolesti ili ozljede moždanog tkiva), vodiči migrirajućih neurona na putu od mjesta posljednje mitoze do konačnog odredišta, održavanje homeostaze iz pH vrijednosti izvanstanične tekućine moždanog tkiva, sinteza glutamina (koji je preteča za sintezu neurotransmitera glutamata u neuronima).<sup>1</sup>

### 2.1.2. Stanična biologija neurona

Neuroni su stanice koje sintetiziraju više raznolikih proteina nego bilo koje druge stanice (osim možda imunoloških), i njih se može podijeliti u tri skupine: proteini koji se sintetiziraju u citosolu i ostaju tamo, proteini koji se sintetiziraju u citosolu i potom odlaze u mitohondrije, jezgri ili peroksisome, i proteini čija je sinteza usko vezana uz sustave staničnih membrana pa tako jedna vrsta ostaje pričvršćena uz membrane endoplazmatske mrežice, druga ostaje u lumenu, a treća nakon sinteze odlazi do drugih organela. Sinteza svih proteina započinje na ribosomima u citosolu, a oni se potom usmjeruju kroz stanicu i ciljano razmještaju kako bi mogli ispravno putovati u stanici.

Posebnu ulogu u usmjerenom kretanju proteina i drugih čestica kroz neuron ima složeni sustav razgranatih membranskih cjevčica i vezikula, koji su sastavljeni od endoplazmatskog retikuluma, Golgijevog aparata, lizosoma, endosoma, transportnih vezikula i sekrecijskih i sinaptičkih mjehurića. Tako se novosintetizirani proteini usmjeruju kroz stanicu, uz istodobno modificiranje, te se pohranjuju u posebna spremišta sve dok se procesom egzocitoze ne izbacuju u okolinu susjednog neurona.

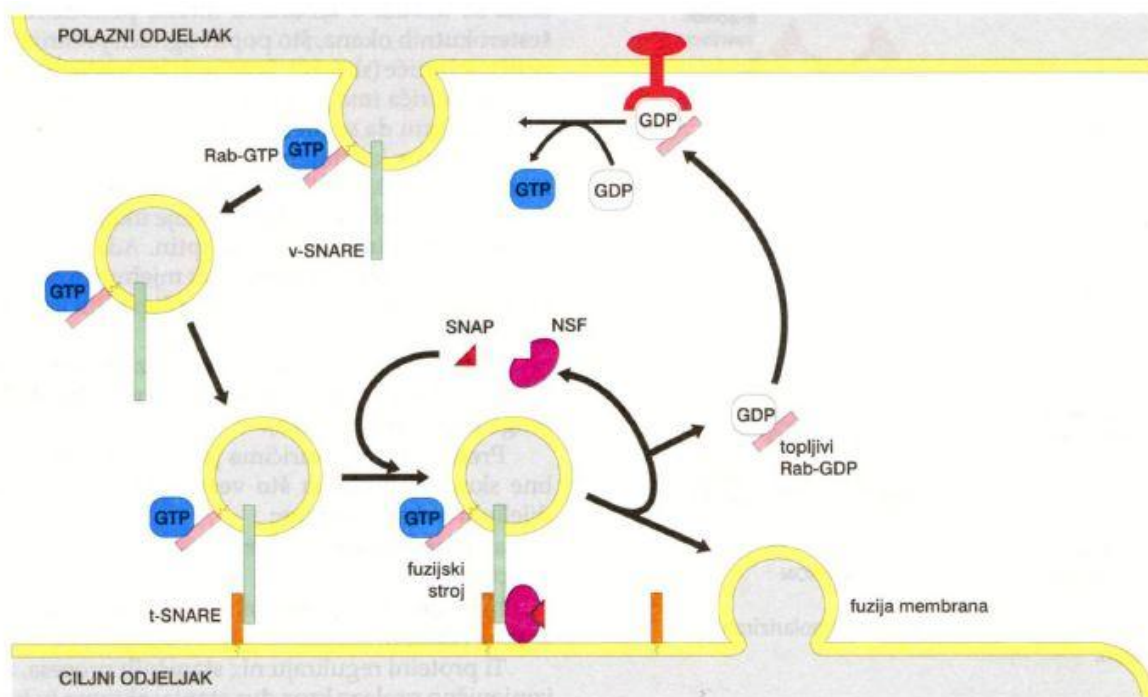
Nakon sinteze proteina na ribosomima, proteini putuju do *trans*-Golgijeve mrežice iz koje se transportne vezikule odašilju prema staničnim membranama, gdje membranski proteini i lipidi tih vezikula služe obnavljanju same stanične membrane nakon što se u procesu egzocitoze topljivi proteini iz njih izluče u okolinu stanice.

Karakteristika svih stanica je proizvodnja proteoglikana i glikoproteina koji izgrađuju izvanstanični matriks. To je proces koji se odvija sporo i neprekidno i u tom slučaju govorimo

o procesu konstitucijske egzocitoze. U slučaju egzocitoze kod specijaliziranih stanica poput neurona, riječ je o nadziranom sekrecijskom putu, gdje se proteini i druge molekule koje se izlučuju najprije pohranjuju u sekrecijskim i sinaptičkim vezikulama, i potom otpuštaju iz njih djelovanjem specifičnog signala.

Sinaptičke vezikule sadrže pohranjene molekule neurotransmitera, npr. acetilkolina, monoamina, GABA, glutamata i dr. Neurotransmiteri su signalne molekule koje presinaptički neuron sintetizira i tijekom sinaptičke signalizacije egzocitozom oslobađa u sinaptičku pukotinu. U toj pukotini se signalna molekula veže za specifični receptor koji je smješten u membrani postsinaptičke stanice i time mijenja njenu aktivnost na specifičan način. Sinteza sinaptičkih vezikula kreće u perikarionu i one putuju do sinaptičkog završetka. Sinteza transmitterskih molekula i kružni ciklus egzocitoze, obnavljanje i ponovno punjenje sinaptičkih vezikula se odvija lokalno u samom presinaptičkom aksonskom završetku.

Karakteristike staničnih organela su uglavnom uvjetovane membranskim proteinima, što omogućuje usmjereno kretanje vezikula i njihovo stapanje s odgovarajućim drugim odjeljcima, i na taj način je određeno njihovo usmjereno kretanje kroz stanicu. Dvije skupine proteina, SNARE i Rab, imaju ključnu ulogu u ispravnom sidrenju vezikula i međusobnom prepoznavanju dviju membrana koje se stapaju. SNARE-proteini (od eng. *soluble N-ethylmaleimid-sensitive-factor attachemnt protein receptor*) postoje kao dva komplementarna skupa proteina: v-SNARE proteini se nalaze na membrani vezikula i t-SNARE proteini koji se nalaze na ciljnoj membrani. Ti proteini se nalaze u membranama živčanih stanica, gdje imaju ulogu posrednika u stapanju sinaptičkih mjehurića uz presinaptičku membranu aksonskih završetaka. Za potpuno stapanje dviju membrana nisu dovoljni samo SNARE-proteini, nego i dodatni proteini poput NSF (od eng. *N-ethylmaleimide sensitive fusion proteins*) i SNAP (od eng. *synaptosomal nerve-associated protein*), a cijeli proteinski sklop se naziva „fuzijski stroj“. <sup>4</sup>



Slika 3. Četiri skupine proteina oblikuju „fuzijski stroj“. v-SNARE na membrani sinaptičkih vezikula i t-SNARE na ciljnoj membrani. (Preuzeto iz <sup>5</sup>)

### 2.1.3. Membranski i akcijski potencijal

Ioni imaju ključnu ulogu u ekscitabilnosti mišića i živca. Izvanstanična i unutarstanična tekućina sadrže iste vrste iona, ali u različitim koncentracijama. Obzirom da su ioni električki nabijeni, razlike u koncentracijama doprinose različitim elektrokemijskim potencijalima sa svake strane membrane i tu pojavu nazivamo membranski potencijal. Ioni kroz staničnu membranu neurona mogu proći krećući se pasivno niz elektrokemijski gradijent ili aktivnim prijenosom nasuprot elektrokemijskom gradijentu, trošeći energiju.

Signalne funkcije neurona temelje se na promjenama membranskog potencijala i pri tome specifične promjene membranskog potencijala imaju specifična funkcionalna značenja. Nernstova jednadžba pokazuje kako kretanje iona kroz membranu stvara razliku električnog potencijala. Pri difuziji neke tvari kroz otopinu, javlja se 'kemijska sila' koja pokreće molekule iz područja veće koncentracije, u područje manje. Ta sila molekule pokreće niz gradijent koncentracije.

$$E = E^{\circ} - \frac{RT}{zF} \ln \frac{[I]_{\text{konačno}}}{[I]_{\text{početno}}}$$

gdje je R-opća plinska konstanta, T-apsolutna temperatura, z-naboj iona, F-Faradayjeva konstanta, E-elektromotorna sila članka (pri nekoj temperaturi),  $E^{\circ}$ -standardni redukcijski elektrodni potencijal, a I-kemijska vrsta. Za bilo koju vrstu iona, ravnotežni potencijal (ili samo membranski potencijal) je potencijal pri kojem nema neto protjecanja iona kroz membranu. Membranski potencijal samo ponekad odgovara ravnotežnom potencijalu. Tako je membrana glije u mirovanju propusna samo za kalij i membranski potencijal iznosi -75 mV, dok mirujući potencijal neurona iznosi -60 mV, jer ovisi o kretanju i drugih iona kroz membranu. Membrana neurona je propusna za ione  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$ , koji doprinose vrijednosti membranskog potencijala.

Prislonivši jednu elektrodu na zdravi dio živca, a drugu na ozlijeđeni dio, pokazano je da se između njih uspostavlja strujni krug i da je unutrašnjost živca električki negativna u odnosu na izvanstaničnu tekućinu. Godine 1850. Hermann Helmholtz je izmjerio brzinu živčanog impulsa u živcima žabe i čovjeka i on je iznosio 20-40 m/s. Tako je pokazano da je živčani impuls elektrokemijska pojava, odnosno da slaba i lokalna stimulacija živca uzrokuje nastanak manjeg vala depolarizacije koji brzo opada s udaljenošću. Živčani impuls je time opisan kao val depolarizacije koji nastaje u aksonskom brežuljku i duž aksona putuje konstantnom brzinom i amplitudom sve do presinaptičkih završetaka aksona. Električni zapis



živčanog impulsa je nazvan akcijskim potencijalom.

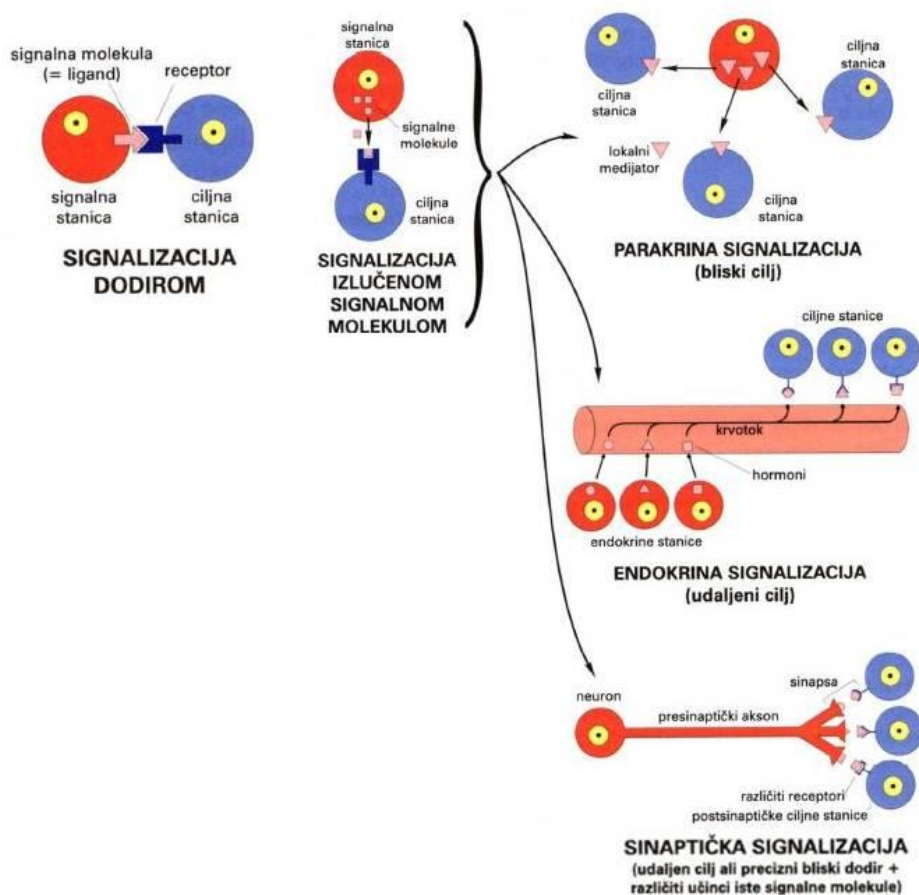
Ako bi u unutrašnjosti membrane postavili pozitivnu elektrodu, a u izvanstaničnom prostoru negativnu, struja će poteći kroz membranu iz stanice prema van, zbog definicije kako struja teče od pozitivnog prema negativnom polu. Zbog toga će se smanjiti polarnost membrane, odnosno, doći će do njene depolarizacije. Ako se primijeni dovoljno snažni udar depolarizirajućom strujom prema van i dosegne se prag depolarizacije, pojavljuje se veliki i kratkotrajni odgovor membrane-akcijski potencijal. Tim opisima se nastoji prikazati priroda membranskog potencijala i koje je njegovo biološko značenje.<sup>6</sup>

#### 2.1.4. Signalne molekule i signalni mehanizmi

Svaki neuron je trajno izložen djelovanju mnogo različitih signala iz okoline, a na te signale odgovara selektivno i u skladu sa fenotipom stečenim diferencijacijom i specijalizacijom tijekom razvoja. Neuron na jedan skup signala mogu odgovarati diferencijacijom, proliferacijom ili pak izvođenjem neke druge specijalizirane funkcije. Međutim, kako se u odraslom mozgu neuron više ne dijele i terminalno su diferencirani oni će u odgovoru na različite skupove signala izvoditi različite funkcije (najčešće signalne). Signalne molekule uglavnom djeluju u kombinacijama, pa možemo zaključiti da živčani sustav rabi po nekoliko stotina takvih molekula u puno različitih kombinacija, ali istovremeno daje i specifični odgovor neurona na podražaj iz okoline. Specifični odgovor će ovisiti o specifičnom skupu receptora na površini neurona i o skupu signalnih kaskada malih unutarstaničnih signalnih molekula, sa pridruženim enzimskim sustavima koji su karakteristični za taj neuron. Prema tome, ista vrsta signalne molekule će različito djelovati na različite ciljne neurone zbog toga što ti ciljni neuroni imaju različite receptore za tu signalnu molekulu ili zato što imaju drugačiji sustav drugih glasnika povezanih s tom vrstom receptora. Štoviše, ista vrsta signalne molekule može kod dvaju različitih neurona dati suprotne učinke.

Signal se može prenijeti izravnim dodiranjem dviju stanica ili tako da signalna stanica izluči u svoju okolinu signalnu molekulu koja se kasnije veže za receptor ciljne stanice (mnogo češće). U živčanom sustavu razlikujemo tri glavne vrste međustanične signalizacije obzirom na udaljenost i smještaj ciljnih stanica: parakrina, endokrina i sinaptička signalizacija. Parakrina signalizacija podrazumijeva lokalne medijatore koji su signalne molekule i koje djeluju na ciljne stanice smještene u neposrednoj okolini signalne stanice. Endokrina

signalizacija podrazumijeva hormone kao signalne molekule, sintetizirane u endokrinim stanicama, a konkretno neurohormoni su signalne molekule sintetizirane u neuroendokrinim neuronima hipotalamusa. Oni krvotokom dolaze do ciljnih stanica smještenih na udaljenim dijelovima organizma pa je ona relativno spora jer ovisi o difuziji i krvnom toku. Sinaptička signalizacija pak podrazumijeva neuronski prijenos signala na većoj udaljenosti, na način da živčani impuls dolazi do ciljne stanice i putuje duž aksona koji je u posebnom dodiru sa djelićem membrane ciljne stanice drugog neurona, mišićne ili žljezdane stanice.<sup>7</sup>



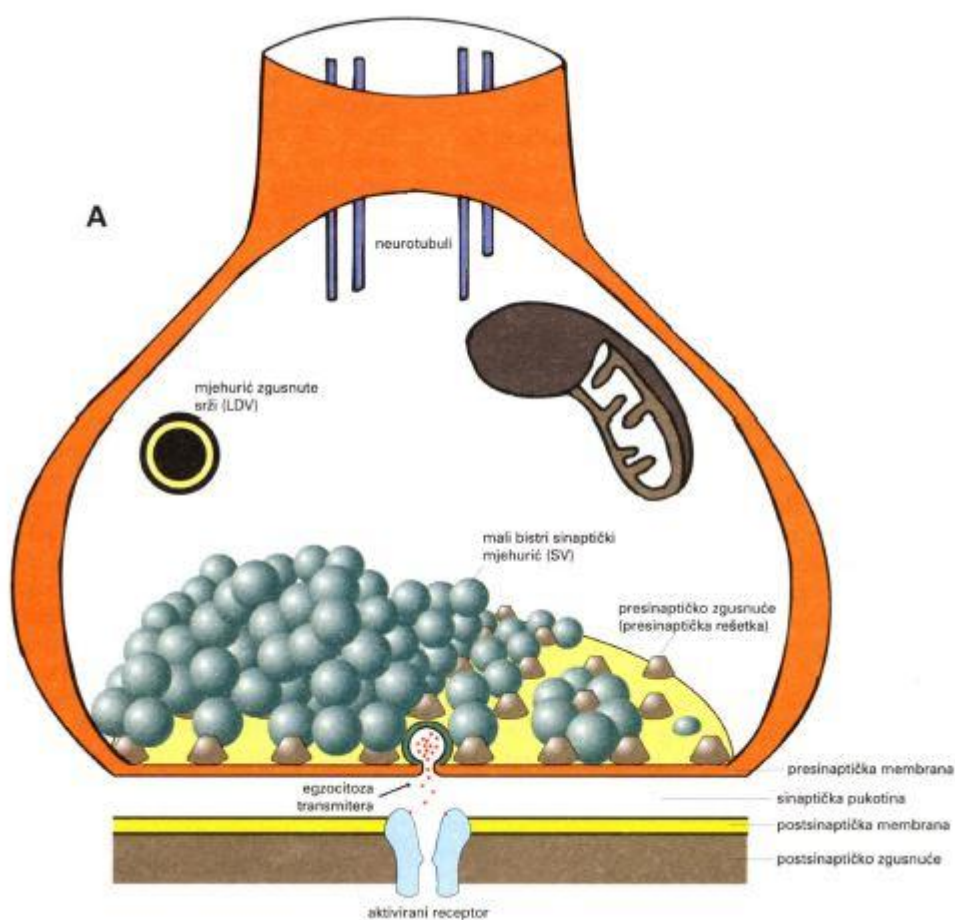
Slika 4. Signalne molekule omogućuju parakrinu, endokrinu i sinaptičku signalizaciju. (Preuzeto i prilagođeno prema <sup>8</sup>)

Ključnu ulogu u integraciji svih signalnih mehanizama i najvažnijim funkcijama živčanog sustava ima kalcij  $\text{Ca}^{2+}$ , koji također djeluje kao univerzalni sekundarni glasnik. Slobodni ioni kalcija u citosolu neurona služe kao „prevoditelji“ signala između promjena membranske ekscitabilnosti i promjena biokemijskih procesa u neuronu. Kad ne bi bilo  $\text{Ca}^{2+}$ , živčani sustav ne bi mogao provoditi biokemijske procese kao odgovore na podražaje koje prima. Promjene membranskog potencijala reguliraju ionske kanale, i ionski kanali reguliraju promjene membranskog potencijala. Tako promjena električne ekscitabilnosti modulira ulazak  $\text{Ca}^{2+}$  u neuron kroz  $\text{Ca}^{2+}$  kanale u membrani neurona, čime se između ostalog regulira egzocitoza neurotransmitera iz presinaptičkog aksonskog završetka.

Neurotransmiteri su prvi glasnici koji mogu aktivirati metabotropne receptore koji aktiviraju niz G-proteina, koji potom reguliraju aktivnost niza efektornih enzima, koji imaju za efekt oslobađanje  $\text{Ca}^{2+}$  iz unutarstaničnog skladišta ili pak utjecanje  $\text{Ca}^{2+}$  u neuron i tako mijenjaju membranski potencijal. Neurotransmiteri mogu aktivirati ionotropne receptore i izravno utjecati na utjecanje  $\text{Ca}^{2+}$  u neuron i posljedična promjena membranskog potencijala utječe na biokemijske procese u neuronu.<sup>9</sup>

## 2.1.5. Sinapsa

Sinapsa je specijalizirana vrsta strukturno-funkcionalnog spoja kroz koji se signal prenosi s jednog (presinaptičkog) neurona na drugu (postsinaptičku) stanicu, koja može biti drugi neuron, mišićna ili žljezdana stanica. Prijenos kroz sinapsu, koji se naziva još i neurotransmisija ili sinaptička transmisija, je kemijske, a ne električne prirode. Razlog tome je činjenica da signal sa presinaptičkog na postsinaptički element sinapse prenose posebne signalne molekule koje se nazivaju neurotransmiteri.



Slika 5. Shematski prikaz kemijske sinapse. Presinaptički element sadrži sinaptičke vezikule koji su skladišta molekula neurotransmitera koji tijekom sinaptičke signalizacije egzocitozom neurotransmitera dolaze u sinaptičku pukotinu i potom difuzijom do receptora u postsinaptičkoj membrani. (preuzeto iz <sup>10</sup>)

Prijenos signala s jednog neurona na drugi je jednosmjernan pa kažemo da je sinapsa funkcionalno asimetrična ili polarizirana. To načelo signalizacije između neurona se naziva zakon dinamičke polarizacije. Osim što je jednosmjerna, signalizacija je i vrlo brza (impuls duž aksona putuje brzinom i do 120 m/s), kratkotrajna (prijenos neurotransmitera kroz sinapsu traje manje od 1 ms), vrlo specifična i precizna.

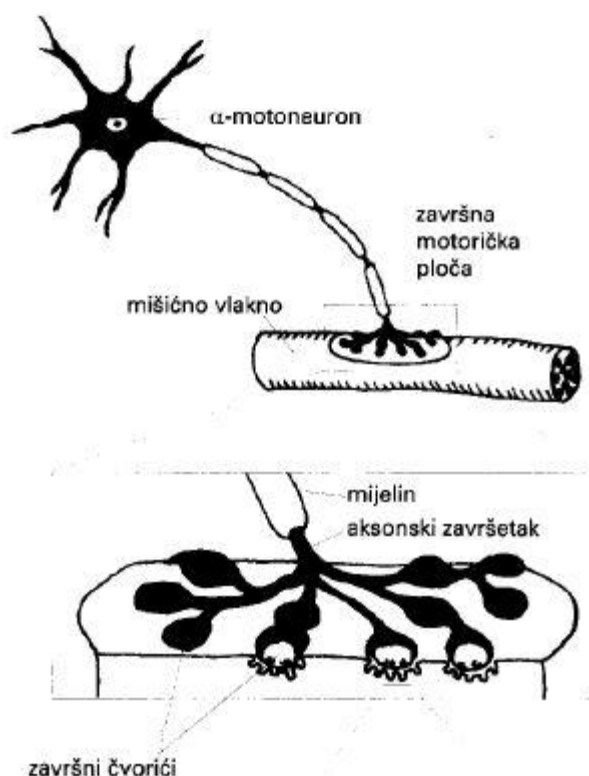
U sinapsi dvije stanice nisu u izravnom dodiru nego su odvojene uskom sinaptičkom pukotinom (slika 5). Kada akcijski potencijal dođe do presinaptičkog završetka aksona, on će potaknuti egzocitozu signalne molekule, neurotransmitera, koji će brzo difundirati kroz sinaptičku pukotinu i vezati se za specifični receptor na postsinaptičkoj membrani ciljne stanice. To je glavni način brze i točne signalizacije na velikim udaljenostima u svakom organizmu koji ima razvijen živčani sustav. Ono što značajno doprinosi kratkotrajnosti i preciznosti djelovanju neurotransmitera je činjenica što oni u sinapsi dosežu veliku lokalnu koncentraciju, zbog čega se oni za svoje receptore vežu relativno niskim afinitetom. Time se neurotransmiter brzo nakon vezanja opet odvoji od receptora i prestaje djelovati na ciljnu stanicu, nakon čega ga hidrolitički enzimi ili posebni proteinski nosači prebacuju natrag u presinaptički završetak s kojeg su krenuli. Dakle, dva najvažnija događaja u sinaptičkom prijenosu signala su egzocitoza neurotransmitera i aktivacija postsinaptičkih receptora, a dva temeljna učinka signalizacije su promjena ionske vodljivosti postsinaptičkih membrani (povećava se) i promjena koncentracije slobodnih iona kalcija  $\text{Ca}^{2+}$  u citoplazmi postsinaptičke stanice. Ti učinci dovode do promjena koje mogu biti bilo kratkotrajne, bilo dugotrajne, i dovode do promjene aktivnosti postsinaptičkih stanica.

Nakon oslobađanja neurotransmitera iz sinaptičkih vezikula u sinaptičku pukotinu, vezikule se obnavljaju u procesu koji se još naziva i recikliranje sinaptičkih vezikula.

Pri oslobađanju neurotransmitera egzocitozom iz presinaptičkog elementa ključnu ulogu ima  $\text{Ca}^{2+}$ , čija je koncentracija veća u izvanstaničnoj tekućini nego u citoplazmi aksona. Ulazak  $\text{Ca}^{2+}$  u presinaptički element je događaj kojim tijekom depolarizacije (dolaska akcijskog potencijala do aksonskog završetka) započinje ciklus egzocitoze sinaptičkih vezikula. Dakle, depolarizacija otvara naponske kanale za  $\text{Ca}^{2+}$  koji su smješteni u membrani presinaptičkog aksonskog završetka. Naglo povećanje koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  je signal za započinjanje egzocitoze sinaptičkih vezikula koje su već usidrene u aktivnoj zoni i time brzo dolazi do oslobađanja neurotransmitera, što omogućuje sinaptičku signalizaciju.

Prvi korak u fuziji membrane vezikule i presinaptičke membrane je formiranje fuzijskog stroja, gdje ključnu ulogu imaju proteini presinaptičke membrane – SNAP-25 i sintaksin i protein membrane sinaptičke vezikule – sinaptobrevin. Ti proteini oblikuju srž fuzijskog stroja čime izravno dolazi do egzocitoze. Protein membrane sinaptičke vezikule – sinaptotagmin, služi kao senzor praćenja povećanja koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  zbog toga što on na sebe veže  $\text{Ca}^{2+}$ , promijeni konformaciju i spaja se sa sintaksinom i ostalim proteinima koji su uključeni u fuziju membrana. Sinaptotagmin je ključni razlog specifičnosti regulirane egzocitoze sinaptičkih vezikula u neuronima na način da u odsutnosti  $\text{Ca}^{2+}$  on sprječava spontanu egzocitozu, a prilikom utjecanja  $\text{Ca}^{2+}$  potiče formiranje fuzijskog stroja.

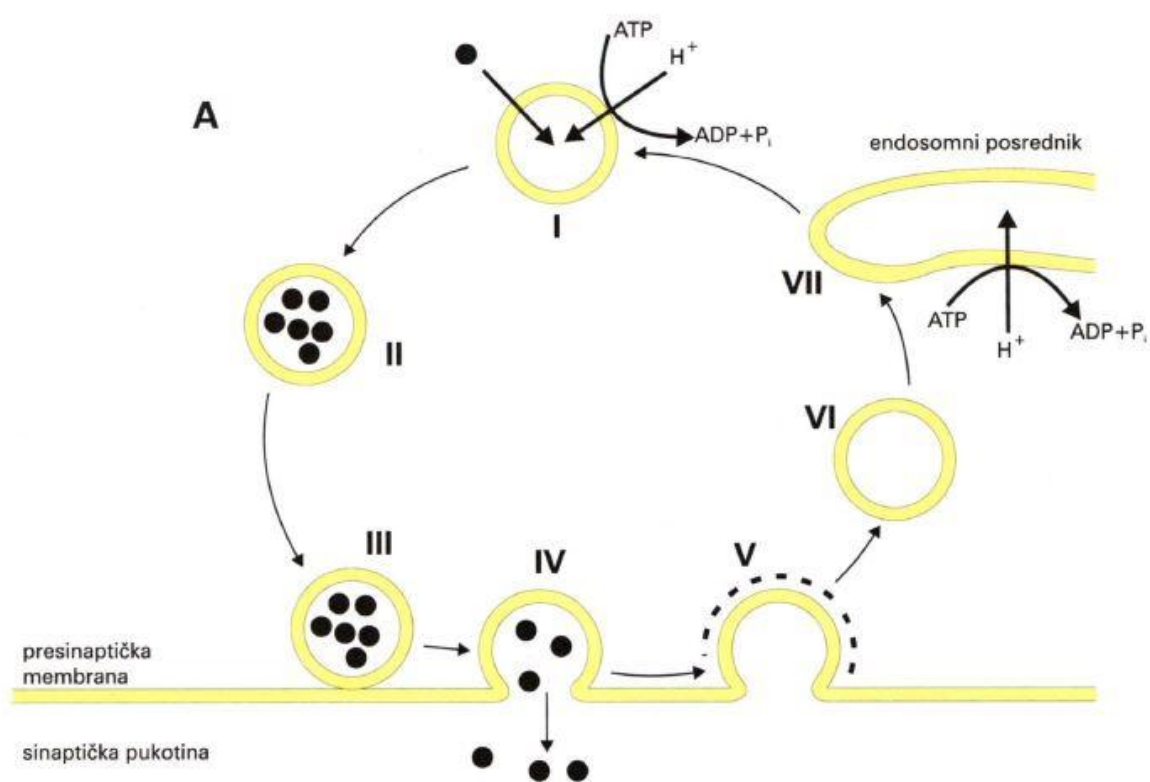
Promjena potencijala postsinaptičke membrane, uzrokovane aktivacijom receptora, naziva se postsinaptički potencijal. Ekscitacijski postsinaptički potencijal depolarizira postsinaptičku membranu, i on ima ključnu ulogu u funkcioniranju neuromišićne sinapse. U tom slučaju, presinaptički element je završetak motoričkog aksona, a postsinaptički element je specijalizirani dio skeletne mišićne stanice.



Slika 6. Neuromišićna sinapsa. Aksoni  $\alpha$ -motoneurona su razgranati u presinaptičke završetke, koji na vrhovima imaju završne čvoriće koji se smještaju u jamice mišićnih vlakana. (Preuzeto iz <sup>11</sup>)

Ekscitacijski neurotransmitter je acetilkolin, koji se veže za postsinaptički nikotinski acetilkolinški receptor. On je ionotropni receptor, čiji integralni dio je kationski kanal, kroz koji kad je otvoren prolaze  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$ . Vezanjem acetilkolina na receptor pri otvaranju kanala, ionska vodljivost membrane se jako povećava za ione  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$ .

Vezanje neurotransmitera za postsinaptički receptor je reverzibilni proces, a svaki ciklus sinaptičke signalizacije završava micanjem neurotransmitera iz sinaptičke pukotine, pa tako mehanizmi odstranjivanja neurotransmitera iz sinaptičke pukotine doprinose brzini i točnosti sinaptičke signalizacije.



Slika 7. Ciklus sinaptičkih vezikula kroz 7 stadija u procesu fuzije membrana i egzocitoze. (Preuzeto iz <sup>12</sup>)

Bakterije roda *Clostridium* proizvode nekoliko izoformi botulinskog neurotoksina koje uzrokuju botulizam blokirajući periferne sinapse, točnije egzocitozu neurotransmitera. Toksin je  $\text{Zn}^{2+}$  proteaza, koja da cijepa tri ključna proteina egzocitoznog fuzijskog stroja: sintaksin, SNAP-25 i sintaksin. <sup>13</sup>

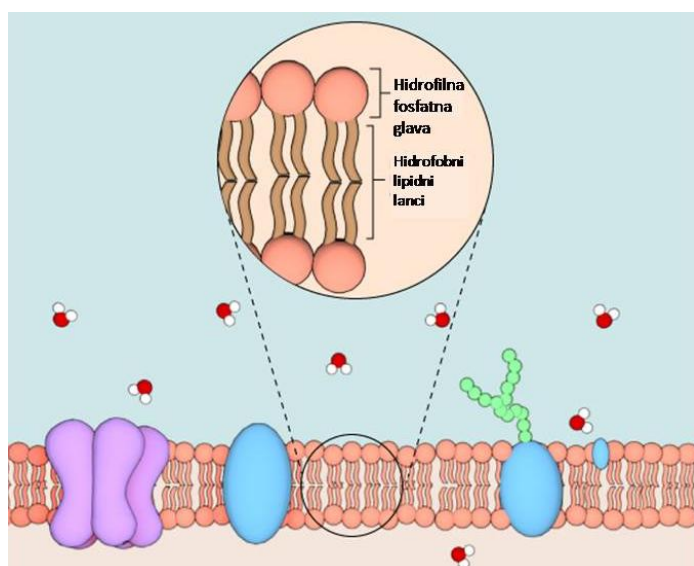
## 2.2. Uloga SNARE proteina u fuziji membrana

### 2.2.1. Stanične membrane i SNARE proteini

Stanične membrane su biološke membrane koje razdvajaju sadržaj stanice od okoline, a za njihovu debljinu su odgovorne tek dvije molekule fosfolipida, u koje su uronjeni proteini i ugljikohidrati u raznim omjerima. Membranski lipidi građeni su od hidrofobnog dijela kojim su okrenuti jedni prema drugima, i od hidrofilnog dijela koji je okrenuti jedan prema unutrašnjosti stanice i drugi prema okolini (slika 8).

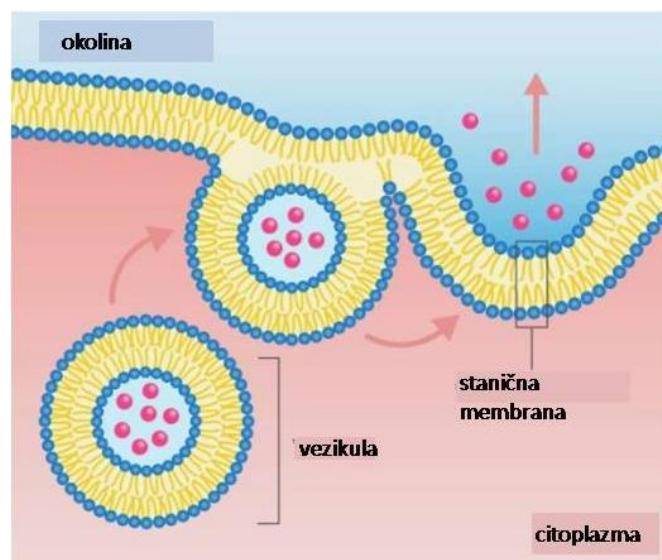
Da bi pojedini odjeljci stanice mogli primiti, transportirati ili otpustiti molekule, membrane trebaju imati sposobnost međusobnog spajanja, odnosno fuzije. U procesu endocitoze, u kojem stanica prihvaća molekule izvana i u kojem sudjeluju receptori na membrani, protein ili veći kompleks se veže za receptor i pomoću specijaliziranih proteina se potiče obližnji dio membrane na savijanje, čime se udubljenje u membrani odvaja i formira vezikulu. U procesu egzocitoze, stanica uz utrošak energije izbacuje tvari iz stanice, npr. izbacivanje neurotransmitera iz neurona u sinaptičku pukotinu.

Ključne komponente membrana koje omogućuju njihovu fuziju su SNARE-proteini (od eng. *soluble N-ethylmaleimid-sensitive-factor attachment protein receptor*), koji su kodirani u genomima svih eukariota i određuju koje će se vezikule fuzionirati. Specifičnost u fuziji membrana je vrlo važna jer osigurava pravilni promet membranskih vezikula i njihovog sadržaja u stanici.<sup>16</sup>



Slika 8. Organizacija lipida u staničnoj membrani- hidrofobni dijelovi okrenuti jedni prema drugima, a hidrofilni prema unutrašnjosti stanice i prema okolini.

(Preuzeto i prilagođeno prema <sup>14</sup>)



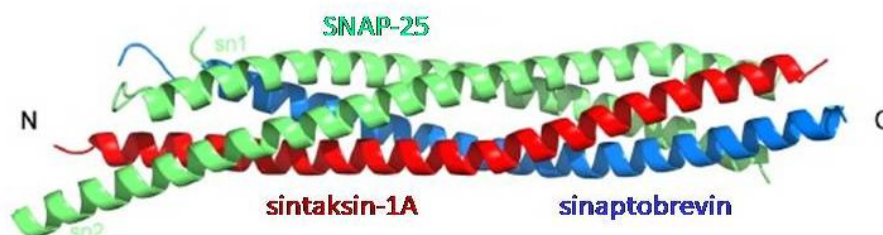
Slika 9. Proces egzocitoze, izlučivanje sadržaja vezikule u okolinu stanice posredovanjem SNARE-proteina. (Preuzeto i prilagođeno prema <sup>15</sup>)



### 2.2.2. Fuzija membrana

Fuzija membrana je jedan od temeljnih procesa koji se odvija u svim živim organizmima, u kojem se dva odvojena lipidna dvosloja stapaju u jednu cjelinu. Proces je od ključne važnosti u događajima poput virusne infekcije, oplodnje stanice, unutarstaničnom transportu i oslobađanju neurotransmitera. Taj strogo kontrolirani proces ovisi o lipidnom sastavu stanice, regulacijskim proteinima, specifičnim interakcijama između proteina i lipida te podražajima koji potiču taj proces.

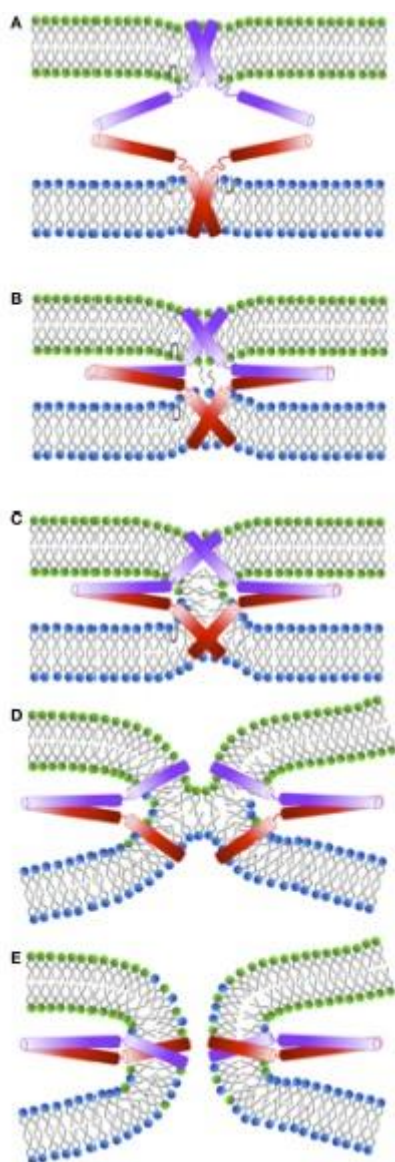
Uloga biološke membrane je da odvaja sadržaj stanice od okoline i upravlja kontroliranim protokom tvari u stanicu i iz stanice. Spontana fuzija membrana u živim organizmima je spriječena zbog elektrostatskih odbojnih sila između negativno nabijenih membranskih površina, i zbog hidrostatskog odbijanja koje je posljedica organizacije uređene vode oko površine membrane. Energija potrebna za savladavanje energetske barijere pri membranskoj fuziji potiče od specijaliziranih fuzijskih proteina, u slučaju egzocitoze, skup SNARE proteina udruženih u kompleks koji se naziva *trans*-SNARE kompleks.



Slika 10. Topologija SNARE kompleksa koji se sastoji od sintaksin-1A (crveno), sinaptobrevina (plavo) i dva SNAP-25 (sn1 i sn2, oba zeleno) proteina (Preuzeto i prilagođeno prema <sup>16</sup>)

Egzocitoza, u kojoj se tvari izbacuju iz stanice u međustanični prostor, je kompleksni proces u kojem se membrane najprije trebaju prepoznati, njihove površine se približavaju i uklanja se voda sa polarne glave lipida, struktura lipidnog dvosloja se potom izobličuje i dolazi do fuzije vanjskog sloja lipida, odnosno hemifuzije, a iza toga slijedi konačna fuzija lipidnih dvosloja.

16



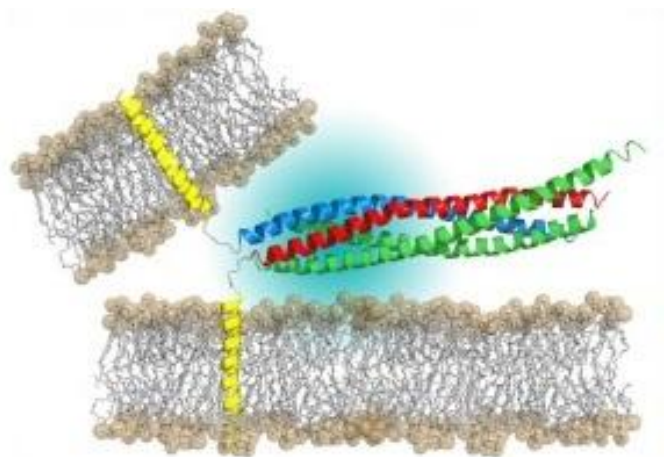
Slika 11. Shematski prikaz fuzije membrana i interakcije proteina na membrani stanice-sinaptobrevin (crveno), sintaksin (ljubičasto) (Preuzeto iz <sup>16</sup>)

U prvoj fazi procesa fuzije membrana, dolazi do približavanja (engl. *docking*) dviju membrana pri čemu sinaptička vezikula dolazi u blizak kontakt sa plazmatskom membranom te dolazi do interakcije proteina na membranama. v-SNARE (od eng. *vesicle SNARE*) protein, sinaptobrevin, se nalazi na površini vezikule, a t-SNARE (od engl. *target SNARE*) proteini, sintaksin i SNAP-25, se nalaze na površini ciljne membrane. Ti proteini se u procesu fuzije membrana udružuju u *trans*-SNARE kompleks (slika 11A). Energija koja se oslobađa formiranjem *trans*-SNARE kompleksa koristi se za približavanje membrana, pri čemu se prevladavaju odbojne sile između negativno nabijenih membrana koje se ujedno djelomično dehidriraju. Stvaranje SNARE kompleksa čini membrane kompetentne za fuziju (engl. *priming step*). Fuzija membrana je nakon toga potaknuta izlučivanjem kalcija ( $\text{Ca}^{2+}$ ), pri čemu je formiranje i stabiliziranje međuprodukata fuzije omogućeno konformacijskim promjenama i dinamikom SNARE molekula (slika 11B). Uspostavlja se hidrofobni kontakt između membrana koje se savijaju te se lipidi u vanjskom fosfolipidnom sloju dviju membrana počinju miješati. Pri tome nastaje struktura oblika stabljike (engl. *stalk*) (slika 11C), iza čega slijedi elongacija tog područja (slika 11D). Na kraju se unutarnji slojevi lipida dviju membrana počinju miješati što vodi formiranju pore (slika 11E). Pora se povećava sve dok ne nastane veća vezikula iz dvije manje vezikule ili sve dok se svi lipidi manje vezikule ne ugrade u ciljnu planarnu membranu. <sup>16</sup>

### 2.2.3. Strukturni model SNARE-proteina i njihove interakcije u egzocitozi

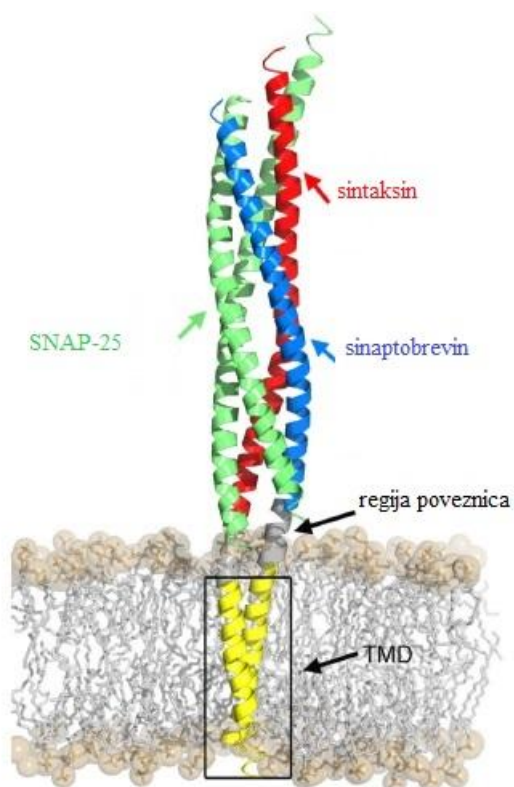
SNARE-proteini sačinjavaju veliku superobitelj proteina koja ima više od 60 članova i nalazi se i u kvašćevim stanicama i stanicama sisavaca. Strukturni motiv je očuvana uvijena zavojnica koja sadrži 60-70 aminokiselina koje označavaju tzv. SNARE motiv. Ti motivi su u sinaptobrevinu i sintaksinu povezani peptidnim transmembranskim domenama (TMD) na C-kraju pomoću male regije poveznice (engl. *linker region*).

*Trans*-SNARE kompleks se sastoji od 4 zavojnice koje su međusobno paralelne. Daljnje sklapanje kompleksa prevodi *trans*-konfiguraciju u *cis* u kojoj su SNARE proteini potpuno presavijeni i smješteni na istoj membrani. Treći interakcijski partner je SNAP-25, koji se sastoji od 2 SNARE motiva koji su povezani sa regijom poveznicom i pomoću nekoliko palmitoilnih repova pričvršćeni za plazmatsku membranu. Regija poveznica, koja spaja SNARE motiv i transmembransku domenu, ima pozitivno nabijene aminokiselinske ostatke koji su potrebni za miješanje membranskih lipida i potpunu fuziju membrana. Ta regija služi za prijenos sile čime pomaže napredovanju stresa koji je generiran u procesu fuzije membrana.



Slika 12. Strukturni model SNARE kompleksa u koraku prije fuzije membrana.

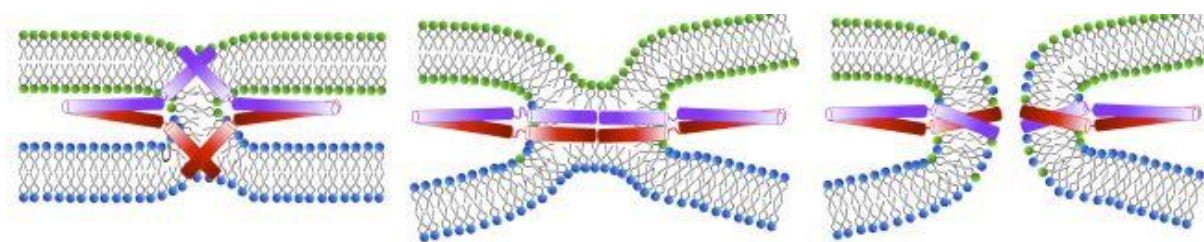
Transmembranske domene proteina sintaksina i sinaptobrevina su smještene u početnim membranama  
(Preuzeto iz <sup>16</sup>)



Slika 13. Strukturni model *cis*-SNARE kompleksa nakon fuzije membrana, koji se sastoji od dva SNAP-25, jednog sintaksina i jednog sinaptobrevina (Preuzeto iz <sup>16</sup>)

#### 2.2.4. Uloga TMD-a i važnost interakcija između lipida i proteina u fuziji membrana

Dvije važne uloge transmembranskih domena su formiranje stabljike (engl. *stalk*) i ostalih hemifuzijskih prijelaznih stanja i unaprjeđivanje fuzije do samog kraja, sa konačnim miješanjem unutarnjih lipida i formiranjem pore. Jedna od uloga TMD-a u formiranju pore je kretanje nenabijenog C-kraja TMD-a u unutrašnjost membrane, što je inducirano silom vučenja SNARE kompleksa. Formiranje i ekspanzija fuzijske pore je kritični korak za konačnu i potpunu fuziju membrana. Pokazano je da uspostavljanjem kontakta između TMD-ova između t- i v-SNARE proteina pomaže miješanju lipida.



Slika 14. Alternativni mehanizam formiranja fuzijske pore umetanjem C-kraja TMD-a u unutrašnjost membrane. (preuzeto iz <sup>16</sup>)

Važni faktor u brzom regulaciji egzocitoze u prijenosu neurotransmitera je multimerizacija SNARE kompleksa. Da bi SNARE-proteini bili funkcionalni u egzocitozi, trebaju precizno prepoznavati ciljane regije koje definiraju mjesta inicijacije fuzije u membrani sa kojom se stapaju. Velika gustoća SNARE proteina je zabilježena u membranama sinaptičkih vezikula, kao i u plazmatskim membranama. Tu su SNARE-proteini organizirani u klastere, što omogućuje brzu interakciju sa komplementarnim partnerima i tako se smatra da je gustoća SNARE proteina najvažniji parametar u određivanju kinetike fuzije membrana i doseg do kojeg se liposomi stapaju.

Pri prvom kontaktu membrana koje se približavaju, uređena voda se treba maknuti, a lateralna tenzija savladati. I da bi se strukturalna pregrađivanja membranskih lipida tijekom fuzije mogla odvijati, fuzijski peptidi reduciraju energetska barijeru za proces fuzije pomoću specifičnih protein-protein i protein-lipid interakcija. Pri tome, sklonost membrane prema fuziji lipidnih dvosloja ovisi o lipidnom sastavu membrane i unutrašnjoj lipidnoj geometriji.

Ključni korak na početku fuzije membrana je uspostavljanje hidrofobnog kontakta između membrana, primjerice ispružanjem lipida, što je potpomognuto prisutnošću SNARE-

proteina, čime je pokazana njihova dodatna uloga u destabilizaciji u neposrednoj lipidnoj okolini. Općenito, brzina fuzije membrana se povećava smanjenjem radijusa vezikule.

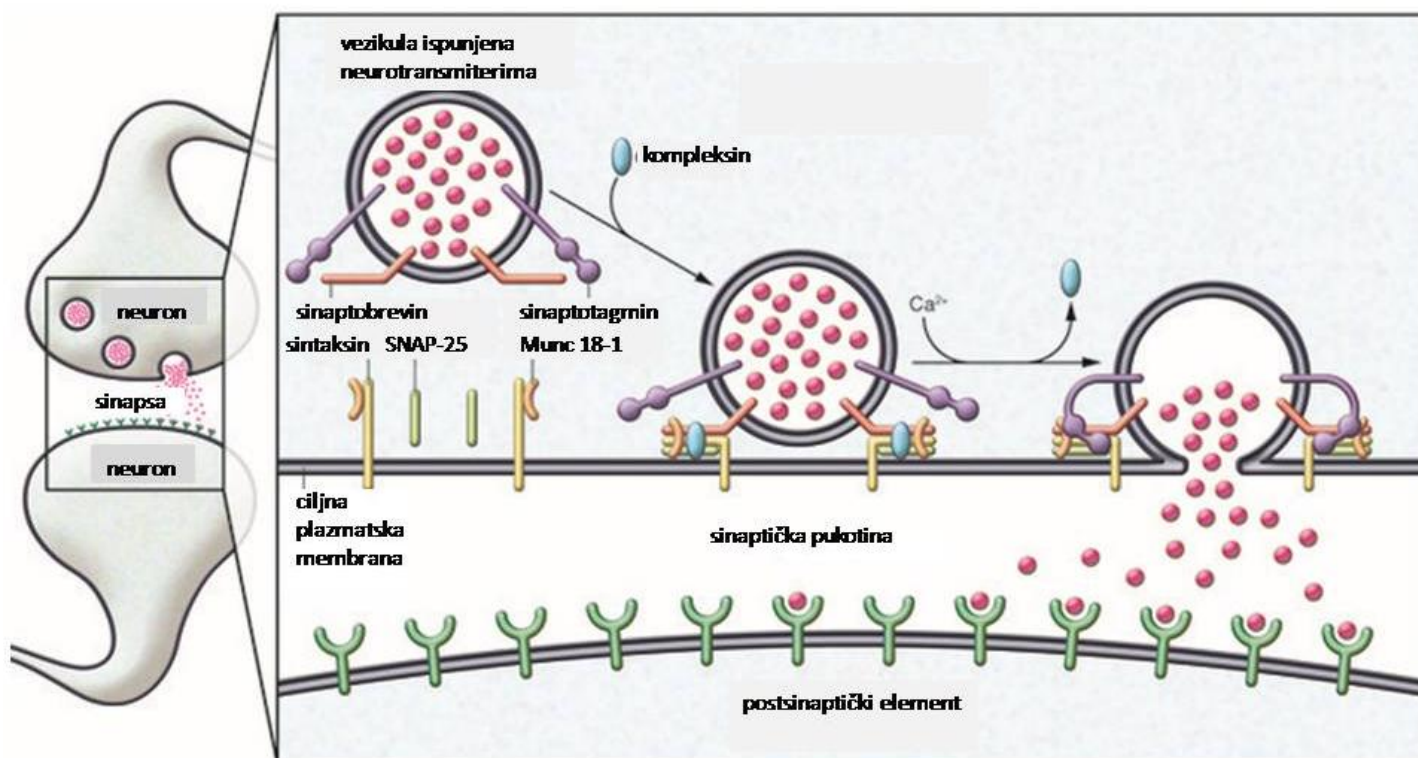
I plazmatska membrana i membrana vezikule sadrže negativno nabijene lipide u unutarnjem i vanjskom sloju, što u početku uzrokuje njihovo odbijanje i sprječava spontanu fuziju. To doprinosi točnosti trenutka membranske fuzije pomoću dodavanja dvovalentnog kationa, najčešće kalcija. Tim kationom se zasjenjuje negativni naboj lipida i premošćuje membrane, na način da se one vežu na oba kraja iona.

Kolesterol također ima ulogu tijekom membranske fuzije i egzocitoza se naglo smanjuje u njegovoj odsutnosti. Kolesterol mijenja vrijeme života pojedinih intermedijera pri fuziji membrana, mijenja zakrivljenost membrana i direktno intereagira sa fuzijskim proteinima, što rezultira promjenom njihove distribucije. SNARE-proteini su obično smješteni u područjima bogatim kolesterolom.<sup>16</sup>

#### 2.2.5. Regulacijski proteini u egzocitozi potpomognutoj SNARE-proteinima

Osim SNARE-proteina koji su opisani kao generatori energije u intracelularnoj egzocitozi, postoji niz regulacijskih proteina poput Munc18-1, sinaptotagmin i kompleksin koji su u eukariotskoj stanici esencijalni za egzocitozu. Oni omogućuju da egzocitoza bude prostorno precizno regulirana u trenutku pristizanja signala, posebice oslobađanje neurotransmitera potaknuto izlučivanjem  $\text{Ca}^{2+}$  iona. Munc18-1 protein je direktno vezan za sintaksin u zatvorenoj konfiguraciji i time regulira dostupnost sintaksina za formiranje SNARE-kompleksa. Konformacijska promjena u određenoj domeni Munc18-1 proteina pokreće uspostavljenje prvog kontakta između membrana (engl. *priming*). Kompleksin je specifični ligand koji povezuje srž SNARE-kompleksa i kontrolira prijenos sile koja se generira formiranjem SNARE-kompleksa. Također pomaže u prostornom pozicioniranju SNARE-kompleksa u stanju prije fuzije membrana i omogućuje sinkronizaciju fuzije tako što povećava bazen sinaptičkih vezikula. Sinaptotagmin pak pokreće fuziju nakon stimulacije kalcijem  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>16</sup>





Slika 15. Shematski prikaz interakcije proteina SNARE-kompleksa u sinapsi. (Preuzeto iz <sup>17)</sup>)

## 2.3. Mehanizam djelovanja neurotoksina botulina

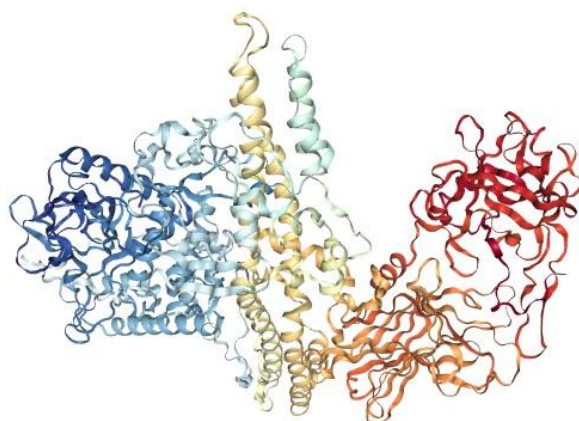
### 2.3.1. Botulinski neurotoksin

Neurotoksini botulina su najotrovniji poznati toksini među svim bakterijskim, životinjskim, biljnim i kemijskim otrovnim spojevima, koji inteziraju i napadaju jedan od najkompleksnijih fizioloških procesa, neuroegzocitozu viših organizama. Glavni razlog visoke toksičnosti je kumulativni efekt niza koraka, gdje svaki korak ima ograničeni učinak, a letalna doza za čovjeka iznosi 1ng/kg. Da bi se inducirao botulizam kod odraslih dovoljno je unijeti 30 ng oralnim putem, čime se pokreće niz neuroloških oboljenja poput paralize ili disautonomije, a u ozbiljnijim slučajevima može biti smrtonosan bez liječenja. Botulizam kod ljudi je najčešće uzrokovan konzumiranjem zaražene hrane (koja je neadekvatno očuvana).

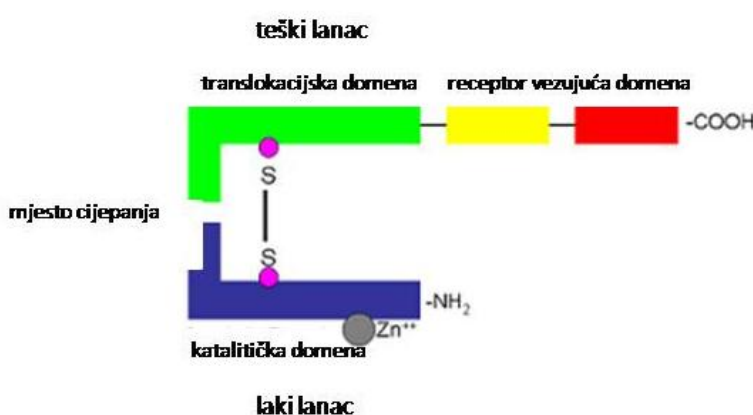
Produkcija neurotoksina botulina je zabilježena kod gram-pozitivnih, sporogenih anaerobnih bakterija koje pripadaju rodu *Clostridium*. Među više od 200 *Clostridium* vrsta, njih 15 proizvodi vrlo potentne toksine koji su uzročnici paralizirajućih neurotoksina kod biljaka i životinja. Iako ne postoji strategija kojom bi napali i preživjeli u domaćinima kralježnjaka, bakterije su evoluirale u proizvodnji potentnog toksina koji ima za cilj napasti specifični proces neuroegzocitoze, pri čemu se razmnožavaju i žive na jednom mjestu, a domaćina ubijaju na značajnoj udaljenosti od tog mjesta. Konačni učinak djelovanja toksina je inhibicija neurotransmisije acetilkolina na perifernom dijelu živčanog sustava.

Za razliku od ostalih bakterijskih bolesti gdje bakterije koloniziraju organizam u kojem se nastane, bakterije *C. botulinum* proizvode toksin koji ima učinak na konačnu metu - živčane završetke u organizmu domaćina, što je kronološki i prostorno na velikoj udaljenosti od mjesta razmnožavanja bakterija. Intoksikacija organizma se može dogoditi mnogo dana, čak i godina nakon što je neurotoksin sintetiziran te čak i nakon smrti bakterija. To je moguće zbog velike stabilnosti kompleksa neurotoksina botulina sa ne-toksičnim ne-hemaglutininskim proteinom koji je otporan na kiseli pH i proteolitičku degradaciju (uvjeti u probavnom sustavu). I zbog toga, botulinski toksin može proći kroz probavni sustav u neaktiviranom obliku. Bez oštećenja mogu prolaziti kroz fizičke barijere poput želuca i crijevnog epitela. Širenje botulinskog toksina kroz krv i limfu omogućuje dolazak do perifernih živčanih završetaka. Iako nemaju direktni pristup središnjem živčanom sustavu kroz krvno-moždanu barijeru, i najmanja količina botulinskog toksina može doći do središnjeg živčanog sustava koristeći mehanizam transcitoze kod neurona.

Neurotoksini botulina su jednolančani proteini molekulske mase od oko 150 kDa, koji se cijepa u domaćinu na teški (~100 kDa) i laki (~50 kDa) lanac, koji su povezani disulfidnim mostom. Istovremeno sa sintezom botulina sintetiziraju se ne-toksični ne-hemaglutininski protein, nekoliko hemaglutinina ili proteini nepoznatih svojstava. Ovi proteini s botulinom stvaraju netoksične botulinske komplekse. Ne-toksični ne-hemaglutinin na trodimenzijskoj strukturalnoj razini nalikuje botulinskom toksinu, ali nema neurotoksičnu aktivnost. Asocijacija s tim proteinom kompleksu daje dugoročnu stabilnost. Postoji mnogo identificiranih vrsta i podvrsta botulinskog toksina koji se još dalje mogu podijeliti prema mjestu cijepanja proteina, vrsti bakterija koja ih proizvodi, vrsti botulizma koje uzrokuju i dr. <sup>18</sup>



Slika 16. Kristalna struktura neurotoksina botulina serotipa A. (Preuzeto iz <sup>19</sup>)



Slika 17. Shematski prikaz strukture neurotoksina botulina. (Preuzeto iz <sup>20</sup>)



### 2.3.2. Botulinski neurotoksin selektivno prepoznaje živčane završetke

Izvanrednu specifičnost prema neuronima ovi toksini duguju vezanju C-kraja teškog lanca botulinskog toksina za ciljanu živčanu stanicu, kroz interakciju s membranskim receptorom izgrađenim od gangliozida (sa salicilnom kiselinom na završecima), koji se ponašaju kao receptori niskog afiniteta kod kralježnjaka. Kompleksnih gangliozida u vanjskom sloju plazmatske membrane živčanog završetka ima puno, a to su također oblici gangliozida koje botulinski toksini preferiraju (više nego jednostavnije gangliozide). Vezanje je također potpomognuto receptorima visokog afiniteta, koji sadrže glikoproteine.

Dakle, botulinski neurotoksini prepoznaju specifične receptore na ciljnoj živčanoj stanici, međutim nemaju razvijeni nikakvi iznimni afinitet prema živčanim završecima. Ovisno o taksinotipu botulinskog toksina, proteinski receptor je jedan od membranskih proteina združenih s vezikulama: N-vezan glikan-SV2 ili sinaptotagmin.

Dva vezna mjesta za glikoproteine i gangliozide živčanih završetaka su identificirani na C-kraju teškog lanca botulinskog toksina. Nekoliko vrsta botulinskog toksina koji interagiraju sa sinaptotagminom koriste dodatnu interakciju sa membranskim lipidima pomoću hidrofobne petlje u njihovom teškom lancu, locirano između veznog mjesta za gangliozid i sinaptotagmin. Tako, teški lanac nastoji maksimizirati interakciju botulinskog toksina sa neuronskim krajem. SV2 i sinaptotagmin su integralni proteini membrane sinaptičkih vezikula, čija unutarnja domena je izložena živčanom završetku kod kolapsa sinaptičke vezikule sa plazmatskom membranom, kod egzocitoze neurotransmitera. Time se botulinski toksin zadržava unutar reciklirane sinaptičke vezikule, dolazi do zakiseljavanja, koje onda vodi translokaciji lakog lanca u citosol, a istovremeno se disulfidni most između lakog i teškog lanca reducira. Laki lanac je oslobođen u citosol i dolazi do izražaja njegov katalitički efekt. Reciklirana sinaptička vezikula se prema tome ponaša kao trojanski konj koji donosi neurotoksine do živčanog završetka, što je nekoliko desetaka ili stotina nanometara udaljeno od njihove konačne molekulske mete: SNARE-proteina.

Laki lanac botulinskog toksina je metaloproteaza ovisna o cinku i u citosolu neurona cijepa jedan od tri vrste SNARE-proteina: SNAP-25, sinaptobrevin ili sintaksin. Obzirom da SNARE-proteini upravljaju fuzijom sinaptičkih vezikula sa plazmatskom membranom kod egzocitoze, cijepanje SNARE-proteina uzrokuje blokadu egzocitoze neurotransmitera koji ovise o ionima kalcija. Takva vrsta inhibicije neurotransmisije je dugotrajna. Životni vijek botulinskog toksina u međustaničnom prostoru traje nekoliko dana, ali u citosolu neurona

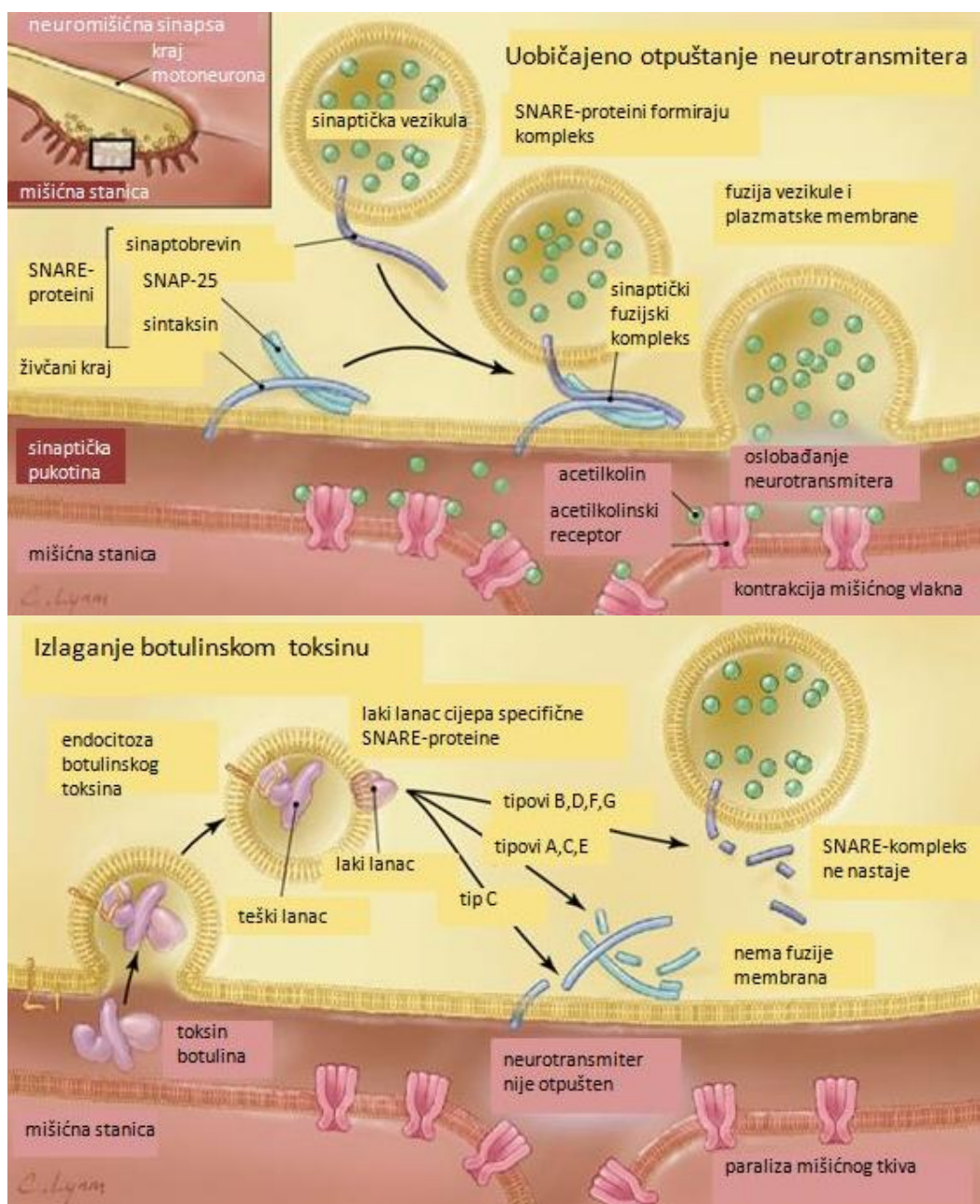
može trajati nekoliko tjedni ili mjeseci. Razlog dugovječnosti toksina u citosolu je njegova interakcija sa ubikvitin-ligazom, enzimom koji sudjeluje u razgradnji proteina u stanici. Ta interakcija sprječava njegov ulazak u proteasom gdje bi se razgradio. Tako je inhibicija egzocitoze omogućena tijekom dugog vremena, unatoč brznoj ponovnoj sintezi pocijepanih SNARE-proteina.<sup>18</sup>

- 
- Gušenje vodi do smrti domaćina
  - Povećani udio paraliziranih mišićnih tkiva
  - Mišićna slabost mišića ždrijela i respiratornog sustava
  - Paraliza mišićnog vlakna zbog manjka akcijskog potencijala
  - Post-sinaptički odgovori
  - Cijepanje SNARE kompleksa izraženo zbog zauzimanja veznih mjesta oštećenim sinaptičkim vezikulama
  - Inhibicija fuzije sinaptičke vezikule sa plazmatskom membranom (spriječeno otpuštanje acetilkolina)
  - Proteolitičko cijepanje SNARE kompleksa lakim lancem toksina
  - Translokacija lakog lanca toksina pri zakiseljavanju recikliranjem sinaptičke vezikule
  - Internalizacija toksina korištenjem reciklirane sinaptičke vezikule kao trojanskog konja
  - Specifično vezanje teškog lanca toksina za periferni živčani kraj
  - Širenje toksina tijelom cirkuliranjem tjelesnih tekućina
  - Botulinski toksin prelazi crijevnu barijeru
  - Unošenje toksina od strane domaćina bez degradacije botulinskog toksina
  - Sinteza kompleksa botulinskog toksina
  - Rast bakterija
  - Klijanje spora

Slika 18. Shematski sažetak koraka pri intoksikaciji neurotoksinom botulina

(Preuzeto iz i prilagođeno prema<sup>18</sup>)

Dva su razloga visoke smrtnosti botulinskog toksina: prvi je taj što neurotoksini napadaju sustav komunikacije između neurona i mišića ili neurona i žlijezda, bez kojih je život nemoguć, a drugi taj što imaju korake koji će optimizirati ili pojačati njihov štetni učinak. Tako, botulinski toksini nisu toliko aktivni koliko su efektivni u svojem djelovanju. Kombinacija svih koraka *in vivo*, gdje je svaki korak limitiran u učinku, ostvaruje značajni efekt zbog akumulacije svih koraka. Za razliku od većine ostalih bakterija, *C. botulinom* ne uzrokuje smrt stanice koju napada, što je vrlo neuobičajena situacija za bakteriju koja u konačnici može uzrokovati smrt većih organizama. Cijepanjem SNARE-kompleksa, onemogućeno je oslobađanje acetilkolina iz sinaptičkih vezikula, čime je onemogućena mišićna kontrakcija, čime dolazi do slabosti mišića ždrijela i dišnog sustava i posljedične smrti gušenjem.<sup>18</sup>



Slika 19. Usporedba mehanizma otpuštanja neurotransmitera pri uobičajenim uvjetima i pri izlaganju botulinskom neurotoksinu. (Preuzeto iz <sup>21</sup>)

### 2.3.3. Botulinski toksin u tretiranju neuropatske boli

Posljednjih 40-ak godina, toksin botulina koristi se u terapiji raznih neuropatskih oboljenja poput distonije, ukočenosti mišića i mišićnih spazama, odnosno grčeva. Distonije su karakterizirane kao dugotrajne mišićne kontrakcije koje mijenjaju držanje tijela.<sup>22</sup> Primjenjuje se također i kod strabizma ili razrokosti, stanja u kojem oči nisu međusobno pravilno usmjerene, jer uzrokuje dugoročne, ali povratne paralize primjenjivanjem manjih količina botulinskog toksina lokalno. Ono što je zajedničko svim primjenama je činjenica da je botulinski toksin apsorbiran sa neuromuskulatorne spojnice ili parasimpatičkog aksonskog završetka do motoričkog neurona, jer je toksin odgovoran za ne-oslobođanje acetilkolina. Važno je naglasiti da su ti efekti lokalni, a ne sistemski raspoređeni duž organizma. Serotipovi botulinskog toksina A i B su efektivni u tretiranju neuropatije; oštećenja ili loše funkcije perifernih živaca. Osim već spomenutog mehanizma djelovanja botulinskog toksina, postoji mehanizam u kojem se inhibira izlučivanje medijatora boli od živčanih završetaka i reducira lokalnu upalu oko živčanih završetaka, deaktivira natrijeve kanale i aksonski transport. Spomenut ćemo pet slučajeva tretiranja neuralgije neurotoksinom botulina koji su klinički dokazani. Prvi je tretiranje trigeminalne neuralgije, vrlo jake probadajuće i sijevajuće boli lica koja nastaje uslijed oštećenja petog moždanog živca koja traje od nekoliko sekundi do nekoliko minuta.<sup>23</sup> Injektiranjem prilagođene količine botulina, zabilježeno je smanjenje u učestalosti boli i brojčani iskaz boli pomoću vizualno-analogne ljestvice boli, koja predstavlja subjektivnu ocjenu boli između 0 (stanje bez boli) i 10 (stanje maksimalne boli). Drugi zabilježen slučaj je tretiranje dijabetičke neuropatije, oštećenja živaca uslijed nekontrolirano visoke razine šećera u krvi, koju karakterizira osjećaj mravinjanja i pečenja i koji se od prstiju širi do lakata i od stopala do koljena. Također je zabilježeno smanjenje boli prema neuropatskoj ljestvici boli. Treći slučaj je okcipitalna neuralgija, vrsta kronične glavobolje, koju karakterizira pulsirajuća ili probadajuća bol u stražnjem dijelu glave. Zabilježeno je poboljšanje u oštroj boli, no ne i u nešto slabijoj dugotrajnoj boli. Daljnji zaključci i istraživanja vezana uz djelovanje botulinskog toksina u svrhu oslobađanja okcipitalne boli su još potrebni. Četvrti slučaj je tretiranje postherpetične neuralgije, bolnog sindroma koji se javlja kao posljedica infekcije virusom herpes zosterom. Terapija botulinom je dovela do poboljšanja kvalitete sna, čiji učinak je trajao 16 tjedana (za polovicu ispitanika) te smanjila ocjenu boli na vizualno-analognj skali boli sa 10 na 1, čiji učinak je trajao 52 dana. Peti slučaj je postoperativna neuralgija, kronična bol nakon operativnog zahvata, koja se razlikuje

od uobičajene kratkotrajne boli. Tretiranje botulinom intradermalno je poboljšalo ocjenu na vizualno-analognj skali boli, osjećaj pečenja, postoperativnu bol, a upotreba analgetika je značajno smanjena. Prema podacima navedenim u istraživanju, sva tretiranja boli osim okcipitalne neuralgije, koja zahtjeva dodatna istraživanja, bila su provedena uz placebo kontrolnu grupu.<sup>24</sup>

#### *2.3.4. Botulinski neurotoksin u zatezanju kože*

Efekt paralize mišića lica je jedna od primjena botulinskog toksina u kozmetičkoj industriji, s ciljem uklanjanja bora lica i vrata koje su povezane sa starenjem. Botulinum toksin A je najčešće korišten serotip toksina. Njegova učinkovitost je demonstrirana kroz nasumična ispitivanja koja su bila kontrolirana placebo grupom. Efekt zatezanja kože se smanjuje nakon 30 dana, a medijan trajanja kliničkih blagodati je pokazano da traje barem četiri mjeseca. Negativne posljedice koje se mogu javljati nakon tretiranja botulinskim toksinom su glavobolje, hematomi (krvni podljevi) ili pojava modrica.<sup>25</sup>

## § 3. LITERATURNI IZVORI

1. M. Judaš, I. Kostović, Temelji neuroznanosti, 1. online izdanje, MF Zagreb, 2001, str. 5,10
2. <https://qbi.uq.edu.au/brain/brain-anatomy/peripheral-nervous-system> (datum pristupanja 24. travnja 2019.)
3. M. Judaš, I. Kostović, Temelji neuroznanosti, 1. online izdanje, MF Zagreb, 2001, str. 54
4. M. Judaš, I. Kostović, Temelji neuroznanosti, 1. online izdanje, MF Zagreb, 2001, str. 55-59, 122
5. M. Judaš, I. Kostović, Temelji neuroznanosti, 1. online izdanje, MF Zagreb, 2001, str. 64
6. M. Judaš, I. Kostović, Temelji neuroznanosti, 1. online izdanje, MF Zagreb, 2001, str. 76, 86
7. M. Judaš, I. Kostović, Temelji neuroznanosti, 1. online izdanje, MF Zagreb, 2001, str. 94, 96
8. M. Judaš, I. Kostović, Temelji neuroznanosti, 1. online izdanje, MF Zagreb, 2001, str. 95
9. M. Judaš, I. Kostović, Temelji neuroznanosti, 1. online izdanje, MF Zagreb, 2001, str. 102, 104
10. M. Judaš, I. Kostović, Temelji neuroznanosti, 1. online izdanje, MF Zagreb, 2001, str. 106
11. M. Judaš, I. Kostović, Temelji neuroznanosti, 1. online izdanje, MF Zagreb, 2001, str. 113
12. M. Judaš, I. Kostović, Temelji neuroznanosti, 1. online izdanje, MF Zagreb, 2001, str. 109
13. M. Judaš, I. Kostović, Temelji neuroznanosti, 1. online izdanje, MF Zagreb, 2001, str. 54, 105-106, 111-112
14. <https://www.mechanobio.info/membrane-dynamics/> (datum pristupanja 18. lipnja 2019.)
15. <https://www.thoughtco.com/what-is-exocytosis-4114427> (datum pristupanja 18. lipnja 2019.)
16. J. Han, K. Pluhackova, R. A. Böckmann, The multifaceted role of SNARE proteins in membrane fusion, *Front. Physiol.* **8** (2017) 5

17. J. H. Hurst, Richard Scheller and Thomas Südhof receive the 2013 Albert Lasker Basic medical research award, *J Clin Invest.* **123(10)** (2013) 4095-4101
18. B. Poulain, M.R. Popoff, Why are botulinum neurotoxin-producing bacteria so diverse and botulinum neurotoxins so toxic?, *Toxins.* **11** (2019) 34
19. <http://www.rcsb.org/structure/3BTA> (datum pristupanja 30. ožujka 2019.)
20. <http://www.ebi.ac.uk/biomodels-main/static-pages.do?page=ModelMonth%2F2010-08> (datum pristupanja 21. lipnja 2019.)
21. [https://www.researchgate.net/figure/Mechanism-of-Action-of-Botulinum-Toxin\\_fig1\\_231739992](https://www.researchgate.net/figure/Mechanism-of-Action-of-Botulinum-Toxin_fig1_231739992) (datum pristupanja 21. lipnja 2019.)
22. <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/neurologija/diskinezije-i-bolesti-malog-mozga/distonije> (datum pristupanja 30. ožujka 2019.)
23. <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/neurologija/neurooftalmoloski-poremecaji-i-ispadi-mozdanih-zivaca/neuralgija-trigeminusa> (datum pristupanja 30. ožujka 2019.)
24. J. Park, H. J. Park, Botulinum toxin for the treatment of neuropathic pain, *Toxins*, **9(9)** (2017) 260
25. A. Brennan, M. Hickey, Botulinum toxin in women's health: An update, *Maturitas*, **119** (2019) 21-24