

Спорные вопросы фармакологии ботулотоксина типа А

© А.В. РЕЗНИК

Медицинский центр «АРКлиник», Санкт-Петербург, Россия

РЕЗЮМЕ

Анализ фармакодинамики и фармакокинетики ботулинического токсина типа А (БТА) позволяет создать «историю жизни» его молекулы в организме и изучить факторы, способные влиять на его биологическое действие. Это имеет большое значение в перспективе применения существующих и разработки новых лекарственных препаратов на основе ботулотоксина, а также противоботулинических средств.

Цель исследования. Систематизировать современные данные, проясняющие наиболее спорные вопросы фармакологии БТА при его системном (ботулизм) и местном медицинском применении.

Материал и методы. В обзоре представлены уникальные молекулярные механизмы, лежащие в основе фармакологического действия БТА: проникновение в организм, распространение, связывание с рецепторами, транслокация, блокирование высвобождения медиаторов, а также факторы, способные влиять на чувствительность организма к ботулиническому токсину на каждом из этих этапов.

Результаты и выводы. Вопросы фармакодинамики и фармакокинетики ботулотоксина требуют дальнейшего изучения. Более глубокое понимание различных аспектов фармакологии ботулотоксина позволит разработать новые направления терапевтического применения препаратов на его основе.

Ключевые слова: ботулинический нейротоксин, ганглиозиды, белок синаптических везикул 2, рецептор фактора роста фибробластов 3, белки SNARE.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРЕ:

Резник А.В. — <https://orcid.org/0000-0002-4636-6978>

Автор, ответственный за переписку: Резник А.В. — e-mail: ksho@yandex.ru, info@arclinic.ru

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Резник А.В. Спорные вопросы фармакологии ботулотоксина типа А. *Пластическая хирургия и эстетическая медицина*. 2021;1:77–84. <https://doi.org/10.17116/plast.hirurgia202101177>

Controversial issues of pharmacology of botulinum toxin type A

© A.V. REZNIK

Medical Center ARclinic, St. Petersburg, Russia

ABSTRACT

Objective. To update the modern data on pharmacology of botulinum toxin type A regarding systemic (botulism) and local medical effects.

Material and methods. The review describes the unique molecular mechanisms of pharmacological action of botulinum toxin type A: entry mechanism, absorption, distribution, binding to receptors, translocation, mediator release blocking, as well as factors affecting sensitivity to botulinum toxin at each of these stages.

Results and conclusion. The issues of pharmacodynamics and pharmacokinetics of botulinum toxin require further research. Comprehensive understanding of various aspects of botulinum toxin pharmacology will ensure the development of new directions for therapeutic use of botulinum toxin-based drugs.

Keywords: botulinum neurotoxin, ganglioside, synaptic vesicle protein 2, fibroblast growth factor receptor 3, SNARE proteins.

INFORMATION ABOUT THE AUTHOR:

Reznik A.V. — <https://orcid.org/0000-0002-4636-6978>

Corresponding author: Reznik A.V. — e-mail: ksho@yandex.ru, info@arclinic.ru

TO CITE THIS ARTICLE:

Reznik AV. Controversial issues of pharmacology of botulinum toxin type A. *Plastic Surgery and Aesthetic Medicine*. 2021;1:77–84. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/plast.hirurgia202101177>

Введение

Ботулинические токсины (БТ) — наиболее сильнодействующие белковые токсины среди бактериальных, животных, растительных и химических отравляющих веществ, являющиеся причи-

ной развития ботулизма [1]. Вместе с тем лекарственные средства на основе БТ имеют огромные перспективы в лечении различных заболеваний. До сих пор продолжается изучение многих вопросов фармакологии БТ, имеющих большое значение в перспективе создания и лекарственных пре-

паратов на их основе, и противоботулинических средств.

В настоящем обзоре описаны уникальные молекулярные механизмы, лежащие в основе различных этапов фармакологического действия БТ типа А (БТА), и возможные факторы, влияющие на чувствительность организма к БТ.

Строение токсинового комплекса и молекулы БТ

БТ представляет собой белок-димер с молекулярной массой 150 кДа с химической формулой C₆₇₆₀H₁₀₄₄₇N₁₇₄₃O₂₀₁₀S₃₂, состоящий из двух цепей: легкой (L) и тяжелой (H). L-цепь составляет приблизительно $\frac{1}{3}$ молекулярного веса и связана с H-цепью дисульфидной связью [2].

L-цепь является протеазой, разрушающей транспортные белки внутри клетки, она образует каталитический домен молекулы БТ. H-цепь содержит 2 домена: домен связывания соединяется с рецепторами на поверхности клетки-мишени, домен транслокации участвует в процессе транслокации L-цепи, формируя канал в мембране. Молекула БТ представляет собой диполь, она имеет электрический заряд, который уменьшается от связывающего домена к каталитическому [3]. Это играет большую роль при ориентации молекулы относительно мембраны клетки для облегчения связывания с рецепторами.

В природной среде БТ синтезируются бактериями в виде комплекса с несколькими белками: одним нетоксичным негемагглютинином (NTNHA) и несколькими гемагглютинаинами [1].

NTNHA имеет молекулярную массу 130 кДа и обладает очень высокой степенью гомологии аминокислотных последовательностей с БТ, отличаясь от молекулы БТ только отсутствием протеазного мотива. Взаимодействуя с молекулой БТ по типу «рука в перчатке», он защищает ее от агрессивного действия факторов окружающей среды, в том числе протеолитических ферментов пищеварительного тракта [4].

Существует три класса гемагглютининов: с молекулярной массой 33—35, 15—18 и 70 кДа [5]. Они напрямую не контактируют с молекулой БТ, присоединяются к NTNHA и играют роль молекулы адгезии при абсорбции токсинового комплекса.

Нетоксичный гемагглютинин и белки гемагглютинины могут образовывать с БТ большое разнообразие мультимерных комплексов, называемых комплексами БТ. Каждый из них содержит только одну молекулу БТ, которая может высвободиться из комплекса при изменении pH среды [2].

Абсорбция и распределение БТ

БТ могут поступать в организм и через поврежденные, и через неповрежденные ткани. В медицинских целях препараты БТА вводят локально, преимущественно инъекционно, в максимальной близости

от клеток-мишеней. Уже разработаны препараты для аппликационного применения БТА, без повреждения покровных тканей, однако пока они не прошли третью фазу клинических исследований [6, 7].

В природных условиях БТ действует системно, вызывая ботулизм, и поступает в организм в основном через неповрежденные мембраны.

В зависимости от пути поступления токсина в организм можно выделить следующие формы ботулизма: пищевой (возникающий после приема пищи, загрязненной ботулотоксином), детский (после приема пищи, загрязненной спорами бактерий), ингаляционный (после вдыхания БТ-содержащих аэрозолей), раневой (в большинстве случаев связан с применением инъекционных наркотиков), ятрогенный [8].

В природных условиях БТ, для того чтобы попасть к клеткам-мишеням, должен пересечь эпителиальные барьеры и достигнуть общей циркуляции, этот процесс называется абсорбцией.

Проникновение БТ через кишечный или легочный эпителий возможно с помощью двух механизмов: через клетку и через межклеточные контакты.

При транцитозе (проникновении через клетку эпителия) БТ связывается ганглиозидными рецепторами на поверхности эпителиоцита и подвергается эндоцитозу (заключению в везикулу). Транспортные везикулы переносят токсин по всей длине клетки и выпускают в общую циркуляцию. При транцитозе не происходит ни изменения структуры токсина, ни выхода его цепей в цитозоль клетки, что отличает связывание БТ с эпителиоцитами от связывания с нейронными клетками [9, 10].

Парацеллюлярный путь (через межклеточные контакты) может происходить как с помощью комплексообразующих белков, так и без них. Комплексообразующие гемагглютинины способны связываться с E-кадгерином межклеточных соединений эпителия и разрушать их, позволяя БТ проникнуть в общий кровоток [4]. Однако молекула БТ может разрушать эпителиальные барьеры и без помощи комплексообразующих белков. А. Maksymowych и соавт. (1999), F. Al-Saleem и соавт. (2012) [11, 12] экспериментально доказали, что введение эквивалентных количеств свободного БТА и комплекса БТА приводит к эквивалентным титрам БТ в общей циркуляции, одинаковой токсичности и эффективности. Однако предполагается, что гемагглютинины увеличивают скорость транспорта БТ через эпителий.

При транспорте через кишечную стенку БТ может связываться с холинергическими и серотонинергическими нейронами энтеральной (кишечной) нервной системы, находящимися в подслизистом пространстве кишки и регулирующими моторную и секреторную активность кишечника, и блокировать их. Этим объясняется появление нарушения моторики кишечника (запоры) как одного из ранних симптомов пищевого и детского ботулизма [13].

Проникнув через эпителиальный барьер, БТ попадает в кровоток и распределяется по всем отделам внеклеточной жидкости в организме, за исключением тех, которые находятся в центральной нервной системе.

К. Eisele и соавт. (2011) провели серию экспериментов [14], показывающих, что при значениях pH, близких к нейтральному (pH артериальной крови 7,37–7,43 [15, 16]), комплекс БТ диссоциирует на активный БТ и комплексообразующие белки с периодом полураспада <1 мин. С момента диссоциации токсинного комплекса комплексообразующие белки перестают иметь клиническое значение.

Ф. Al-Saleem и соавт. (2008) [17] экспериментально доказали, что токсин достигает общей циркуляции без явных изменений в структуре и биологической активности. Общая циркуляция действует как отсек для хранения токсина до тех пор, пока БТ не попадет к клеткам-мишеням. Во время нахождения в общей циркуляции БТ подвергается незначительной биотрансформации, не накапливается в клетках крови и остается в основном в свободном активном состоянии. Концепцию «общая циркуляция — отсек для хранения БТ» подтверждают различные исследования. R. Fagan и соавт. (2009) [18] описали наличие активного БТА в сыворотке крови человека через 11 сут после приема зараженной пищи, A. Sheth и соавт. (2008) [19] — через 25 сут, L. Delbrassinne и соавт. (2018) [20] — через 29 сут.

Из внутрисосудистого жидкого компартмента БТ попадает во внесосудистый компартмент, а затем в межклеточную жидкость. При инъекционном локальном применении в медицинских целях БТ сразу попадает во внесосудистый (или во внутрисосудистый при инъекции в сосуд) компартмент вблизи клеток-мишеней, минуя стадию абсорбции. Из межклеточного компартмента БТ должен попасть к мишени — периферическому холинергическому нервному окончанию и связаться с рецепторами на нем.

Для понимания механизма связывания БТ с рецепторами необходимо представлять, как проходит нейротрансмиссия в синапсе в норме.

Нейротрансмиссия в синапсе в норме

Нейромедиаторы синтезируются в цитозоле нейронов и хранятся в пресинаптическом нервном окончании внутри синаптических пузырьков (везикул). В мембране синаптических пузырьков расположен протонный насос (везикулярная АТФаза), работа которого вызывает повышение концентрации протонов внутри везикулы [8]. Электрохимический градиент протонов обуславливает поступление медиатора из цитозоля в везикулу и накопление в ней. Везикулы с медиатором располагаются в цитоплазме нейрона и связываются со специализированными участками пресинаптической мембраны (активными зонами [21]) в процессе, известном как стыковка [22].

Стыковка везикул с мембраной клетки происходит только в активных зонах и регулируется большим набором транспортных белков [23].

Вследствие прохождения нервного импульса пресинаптическая мембрана аксона деполяризуется, открываются кальциевые каналы и ионы Ca^{2+} поступают внутрь аксона [24]. В ответ на приток Ca^{2+} везикула с медиатором сливается с пресинаптической мембраной в активной зоне. Эта стадия называется праймингом, в ее регуляции участвуют два интегральных мембранных белка синаптической везикулы (синаптобrevин и синаптотаксин), а также два белка в пресинаптической мембране (SNAP25 и синтаксин) и цитозольные белки, включая комплексин [25–28].

Быстрое конформационное изменение везикулы с помощью регуляторных белков приводит к полному слиянию синаптической везикулы с пресинаптической мембраной и образованию поры, через которую нейромедиатор высвобождается в синаптическую щель [29].

Нейромедиатор диффундирует из нервного окончания и связывается с постсинаптическим рецептором, который запускает сигнализацию в постсинаптической клетке. В случае нейромышечного соединения ацетилхолин связывается с рецептором на плазматической мембране миоцита, что влечет за собой деполяризацию мембраны мышечной клетки. Деполяризация мембраны приводит к поступлению Ca^{2+} внутрь миоцита и сокращению мышцы.

Во время высвобождения нейромедиатора просвет синаптической везикулы временно открывается наружу в синаптическую щель, но позже интернализуется в нервные окончания в процессе эндоцитоза. После эндоцитоза везикула вновь наполняется нейромедиатором — и начинается следующий цикл нейротрансмиссии [30].

Связывание БТА с клеткой-мишенью

Связывание активных молекул БТА с клетками-мишенями происходит через рецепторы на поверхности клеток [31]. Для связывания с пресинаптической мембраной аксона необходимо взаимодействие активной молекулы БТА с комбинацией высоко- и низкоаффинных рецепторов [32]. В настоящий момент в этой комбинации описаны 3 рецептора и несколько корецепторов.

Эндоцитоз активной молекулы токсина и дальнейшие ее изменения возможны только после связывания со всей комбинацией рецепторов на поверхности аксона [5]. Связывание с одним рецептором без взаимодействия с другими не приведет к интернализации токсина. Такой многоступенчатый механизм связывания БТА с рецепторами компенсирует низкую концентрацию БТА в циркулирующих жидкостях, высокую скорость движения внеклеточной жидкости вокруг клеток и малую площадь поверхности аксонов.

Первый рецептор — полисиалоганглиозид

Первым рецептором к БТА на поверхности аксона является полисиалоганглиозид GT1b (ПСГ).

Ганглиозиды — это гликозилированные липиды, входящие в состав мембран клеток. Хотя ганглиозиды присутствуют во всех тканях позвоночных, они более распространены в мембранах нейронов [33], где участвуют в оптимальном образовании миелина, аксон-миелиновых взаимодействиях, периферической и центральной стабильности аксонов [32].

Плотность расположения ПСГ на пресинаптической мембране велика. ПСГ организованы в микродомены вблизи активных зон пресинаптической мембраны [34]. Расположение ПСГ-рецепторов в этих зонах имеет большое значение в процессе связывания БТ с остальными рецепторами.

Олигосахаридная (БТ-связывающая часть) ПСГ выступает далеко за пределы поверхности мембраны в синаптическую щель и имеет отрицательный электрический заряд [8]. Молекула БТА представляет собой диполь, в котором домен связывания заряжен положительно [3]. Эта разница электрических зарядов домена связывания БТА и ПСГ-рецепторов (и других анионных липидов мембраны аксона) позволяет переориентировать молекулу БТА по мере продвижения его к мембране, увеличивая вероятность связывания с рецептором.

В настоящее время предполагается, что ПСГ являются начальными связывающими участками, которые выводят токсин из сравнительно большого трехмерного пространства межклеточной жидкости и перемещают в двухмерное пространство плоскости мембраны [5]. Это в свою очередь необходимо для связывания токсина с последующими рецепторами. С одной стороны, связывание с ПСГ необратимо, так как БТА извлекается из межклеточного вещества и закрепляется на мембране аксона. С другой стороны, на этом этапе токсин все еще подвержен воздействию и доступен для нейтрализующих антител.

Вместе с тем ПСГ являются мембранными рецепторами как для БТ, так и для ассоциированных с нейропатией человека антиганглиозидных аутоантител. Выработка аутоантител к ПСГ при нейропатии может играть роль в снижении чувствительности к БТ и возникновении резистентности [35].

Второй рецептор — рецептор фактора роста фибробластов 3

Субдомен НС БТА имеет структурную гомологию с основным фактором роста фибробластов (FGF) [36]. Это сходство структуры дает возможность БТА связываться с белковым рецептором фактора роста фибробластов 3 (FGFR3b) на поверхности аксона с высокой аффинностью [37].

Однако FGFR3b тропен не только к БТА, но и ко многим факторам роста фибробластов. При-

чем тропность этого рецептора к факторам роста выше, чем к БТ. Нативные лиганды для FGFR3 — факторы роста FGF1, FGF2 и FGF9 — конкурируют за связывание с FGFR3 и, занимая рецепторы, способны блокировать поглощение БТА клетками [8].

Кроме того, активность рецепторов FGFR3b регулируют несколько низкоаффинных кофакторов, включая гепарансульфат, нейропиплин-1, аносмин и др. [38]. Неспецифичность рецептора FGFR3, конкуренция за него между БТА и факторами роста фибробластов, влияние кофакторов на активность рецептора могут объяснить уязвимость этого рецепторного механизма и соответственно переменную чувствительность к БТ. Кроме того, при некоторых состояниях, связанных с мутацией FGFR3 (скелетные дисплазии, эпидермальные невулы, себорейный кератоз, гиперинсулинемия), может экспрессироваться дефектный FGFR3 [39—43]. Влияние мутации FGFR3 на чувствительность к БТ еще предстоит изучить.

Третий рецептор — трансмембранный везикулярный рецептор SV2C

SV2 — белковый рецептор, расположенный в мембране везикул [44] всех периферических и центральных нейронов, а также в мембранах секреторных гранул эндокринных клеток [45]. SV2 экспрессируется мембранами везикул клеток, накапливающих не только ацетилхолин, но и ГАМК, дофамин, глутамат, субстанцию Р и некоторые другие медиаторы [46].

В отличие от ПСГ-рецептора, экспрессируемого в синаптическую щель, БТА-связывающий сайт SV2-рецептора выступает в просвет синаптической везикулы и недоступен для токсина, пока везикула находится в цитозоле аксона [47]. SV2 становится доступен для БТА в момент слияния везикулы с пресинаптической мембраной и экзоцитоза ацетилхолина [48].

Таким образом, связывание БТА со всей комбинацией рецепторов происходит в активных зонах только после слияния синаптической везикулы с пресинаптической мембраной и открытия просвета везикулы в синаптическую щель, что облегчает последующий эндоцитоз БТА. После связывания с комбинацией рецепторов и эндоцитоза БТ становится недоступен влиянию нейтрализующих антител.

Эндоцитоз

Связывание молекулы БТА с рецепторами приводит к рецептор-опосредованному эндоцитозу как рецепторов, так и токсина [49].

Просвет везикулы сразу после эндоцитоза имеет нейтральный pH. Протонный насос везикулярной АТФазы управляет повторным поглощением нейромедиатора [50] и накачивает протоны в синаптическую везикулу, в результате чего pH просвета везикулы постепенно уменьшается [51].

Транслокация L-цепи

Закисление среды везикулы приводит к необратимым конформационным изменениям как Н-цепи, так и L-цепи БТА. В результате этих изменений Н-цепь, оставаясь связанной через рецепторы с мембраной везикулы, формирует в ней трансмембранный Н-канал [52, 53], через который из везикулы в цитозоль выходит конформационно измененная L-цепь [54], после чего разрушается связывающая цепь дисульфидная связь.

Транслокация L-цепи происходит между рН 4,5 и 6. Снижение рН приводит к протонированию карбоксилатных аминокислотных остатков, входящих в состав Н-цепей и L-цепей БТА. Карбоксилатные остатки располагаются на одной стороне молекулы токсина, и их протонирование приводит к значительным изменениям формы молекулы [55]. Молекула БТА положительно заряженной поверхностью взаимодействует с анионной поверхностью мембраны везикулы, образуя белково-липидный комплекс [56]. Предполагается, что L-цепь становится «расплавленной белковой глобулой», которая приобретает гидрофобность [8]. С одной стороны, гидрофобность L-цепи обеспечивает ее прохождение через мембранный канал, сформированный Н-цепью. С другой стороны, при снижении рН более гидрофобной становится та поверхность молекулы, где располагается дисульфидная связь. Это обеспечивает сохранение целостности дисульфидной связи до полной транслокации L-цепи.

Для того чтобы пересечь мембрану везикулы, L-цепь должна быть дисульфидно связана с Н-цепью на всем протяжении процесса транслокации [55]. Преждевременный разрыв дисульфидной связи на любой стадии до ее выхода в цитозоль прерывает транслокацию L-цепи [57].

В завершение процесса транслокации дисульфидная связь разрушается под действием системы тиоредоксинредуктаза (TrxR)—тиоредоксин (Trx), высвобождая L-цепь для экспрессии ее каталитической активности в цитозоле [58].

Система TrxR—Trx — основная окислительно-восстановительная система клетки. TrxR и Trx являются белками цитозольной стороны мембраны везикулы, и их ингибирование может блокировать развитие эффекта БТА на той стадии, где токсин уже недоступен действию нейтрализующих антител [59]. G. Zanetti и соавт. (2015) в экспериментах *in vitro* показали, что ингибиторы ферментной пары TrxR—Trx препятствуют протеазной активности L-цепи всех известных серотипов БТ в культивируемых нейронах, а *in vivo* предотвращают токсин-индуцированный паралич у мышей независимо от серотипа БТ [60].

В модели жизненного цикла разрыв дисульфидной связи означает конец внутриклеточного существования интактной активной молекулы БТА (голотоксина). Даже если бы L-цепь или Н-цепь были экс-

портированы из клетки, ни одна из них сама по себе не могла бы нарушить функцию клетки. Только голотоксин обладает способностью проходить множество стадий, которые завершаются блокадой передачи [61]. С другой стороны, конформационные изменения, связанные с рН-индуцированной транслокацией L-цепи в цитозоль, создают «ловушку», которая делает невозможной как ретротранслокацию в эндосому, так и возвращение активной молекулы токсина во внешнюю среду клетки [5].

Расщепление L-цепью транспортных белков

Измененная L-цепь через Н-канал выходит в цитозоль нейрона, где действует как металлопротеаза. Она ферментативно расщепляет девять аминокислот из С-конца растворимого N-этилmaleимидо-чувствительного рецептора прикрепления фактора (SNARE) белка SNAP25 (SNAP25206), в результате чего образуется SNAP25197 [62, 63]. Интактный SNAP25 необходим для прикрепления везикулы с медиатором и последующего высвобождения нейротрансмиттера, также он непосредственно участвует в регуляции работы Са-каналов пресинаптической мембраны [64]. Расщепление SNAP25 нарушает экзоцитоз медиаторов, вызывая блокаду передачи нервного импульса [65].

Синаптическая активность очень чувствительна к расщеплению минимального количества SNAP25. Выдвигаются гипотезы, что SNAP25 в цитозоле нейронов существует в виде различных пулов и лишь небольшое количество SNAP25 активно участвует в процессе экзоцитоза и доступно действию L-протеазы [66]. Это подтверждают эксперименты, показывающие, что расщепление 10—15% от общего внутриклеточного пула SNAP25 достаточно для полной блокады высвобождения нейромедиатора [67—69]. Расщепление L-протеазой всего 2—3% пула SNAP25 приводит к блокированию миниатюрных постсинаптических потенциалов клеток (слабой деполяризации постсинаптических мембран в состоянии нейромышечного покоя) [70].

Вместе с тем белок SNAP25197, продукт протеолиза SNAP25, самостоятельно выступает ингибитором экзоцитоза [71]. F. Meunier и соавт. [72] описали, что SNAP25197 способен долгое время сохраняться в цитозоле в составе непроизводительного комплекса SNARE, увеличивая продолжительность действия БТА. Тогда как удаление нескольких аминокислот из SNAP25197 приводит быстрому восстановлению экзоцитоза.

Метаболизм цинка при транслокации

Цинк необходим для каталитической активности L-цепи. Одна молекула ботулинического голотоксина содержит один атом цинка, удерживаемый цинк-связывающей аминокислотной последовательностью L-цепи, и это связывание обратимо [73].

Закисление везикулы вызывает протонирование цинксвязывающих участков молекулы БТ. При транслокации происходит денатурация L-цепи, при которой теряется целостность хелатного сайта. Это приводит к диссоциации связанного цинка и его присоединению к пулу цитозольного цинка.

L. Simpson и соавт. [74] в эксперименте *in vitro* установили, что удаление цинка из активной молекулы БТ приводило к потере каталитической активности L-цепи в бесклеточных препаратах, но сохранению активности в интактных нервно-мышечных соединениях вследствие того, что интернализированный токсин связывал цитозольный цинк. Таким образом, цинк, который удерживается голотоксином (неповрежденной активной молекулой), не является тем же самым цинком, который связан с каталитически активной L-цепью. L-цепь связывает цитозольный цинк.

Блокирование высвобождения медиаторов

Основной мишенью БТА являются периферические нейроны, где БТ ингибирует высвобождение ацетилхолина [75].

Большое количество исследований, проведенных на клетках, показало, что БТА не только блокирует высвобождение ацетилхолина, но и предотвращает высвобождение многих других нейромедиаторов, если они накапливаются и хранятся в везикулах [32]. К ним относятся адреналин, норадреналин, дофа-

мин [76, 77], глутамат [78], глицин [79], серотонин [80], субстанция Р [81] и др. Исходя из этого, БТ должен рассматриваться не как специфический блокатор выделения ацетилхолина, а как блокатор экзоцитоза различных медиаторов, что имеет огромные перспективы в лечении и профилактике многих заболеваний.

Заключение

Дальнейшее изучение уникальных механизмов фармакологии БТ открывает перспективы поиска возможностей влиять на его действие: пролонгировать или уменьшать длительность эффекта, повышать или понижать чувствительность к БТ определенных групп пациентов, а также поможет разработать протоколы оптимального сочетания применения БТ с различными видами эстетических процедур. Более глубокое понимание множественных аспектов не только нейрональной селективности БТ, но и взаимодействия БТА с ненейрональными клетками позволит найти новые направления терапевтического применения препаратов на основе БТ в разных сферах медицины.

**Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.
The author declares no conflicts of interest.**

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Poulain B, Popoff M. Why Are Botulinum Neurotoxin-Producing Bacteria So Diverse and Botulinum Neurotoxins So Toxic? *Toxins (Basel)*. 2019; 11(1):34. <https://doi.org/10.3390/toxins11010034>
- Berry M. *Botulinum Neurotoxin: Basic Facts, Physiology and Pharmacology*. Atlas of Surgical Therapy for Migraine and Tension-Type Headache. Springer; 2019. https://doi.org/10.1007/978-3-030-29505-9_7
- Fogolari F, Tosatto S, Muraro L, Montecucco C. Electric dipole reorientation in the interaction of botulinum neurotoxins with neuronal membranes. *FEBS Lett*. 2009;583(14):2321-2325. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.06.046>
- Gu S, Rumpel S, Zhou J, Strotmeier J, Bigalke H, Perry K, Shoemaker CB, Rummel A, Jin R. Botulinum Neurotoxin Is Shielded by NTNHA in an Interlocked Complex. *Science*. 2012;335(6071):977-981. <https://doi.org/10.1126/science.1214270>
- Simpson L. The life history of a botulinum toxin molecule. *Toxicon*. 2013; 68:40-59. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.02.014>
- Zhu Z, Stone H, Thach T, Garcia L, Ruegg C. A Novel Botulinum Neurotoxin Topical Gel: Treatment of Allergic Rhinitis in Rats and Comparative Safety Profile. *Am J Rhinol Allergy*. 2012;26(6):450-454. <https://doi.org/10.2500/ajra.2012.26.3785>
- Collins A, Nasir A. Topical Botulinum Toxin. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*. 2010;3(3):35-39. Accessed August 09, 2020. <https://jcadonline.com/topical-botulinum-toxin/>
- Rossetto O, Pirazzini M, Montecucco C. Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights. *Nature Reviews Microbiology*. 2014;12(8): 535-549. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3295>
- Couesnon A, Shimizu T, Popoff M. Differential entry of botulinum neurotoxin A into neuronal and intestinal cells. *Cell Microbiol*. 2009;11(2):289-308. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01253.x>
- Elias M, Al-Saleem F, Ancharski D, Singh A, Nasser Z, Olson RM, Simpson LL. Evidence That Botulinum Toxin Receptors on Epithelial Cells and Neuronal Cells Are Not Identical: Implications for Development of a Non-Neurotropic Vaccine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2010;336(3):605-612. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.175018>
- Maksymowych A, Reinhard M, Malizio C, Goodnough M, Johnson E, Simpson L. Pure Botulinum Neurotoxin Is Absorbed from the Stomach and Small Intestine and Produces Peripheral Neuromuscular Blockade. *Infect Immun*. 1999;67(9):4708-4712. <https://doi.org/10.1128/iai.67.9.4708-4712.1999>
- Al-Saleem F, Ancharski D, Joshi S, Elias M, Singh A, Nasser Z, Simpson LL. Analysis of the Mechanisms That Underlie Absorption of Botulinum Toxin by the Inhalation Route. *Infect Immun*. 2012;80(12):4133-4142. <https://doi.org/10.1128/iai.00669-12>
- Rosow L, Strober J. Infant Botulism: Review and Clinical Update. *Pediatr Neurol*. 2015;52(5):487-492. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2015.01.006>
- Eisele K, Fink K, Vey M, Taylor H. Studies on the dissociation of botulinum neurotoxin type A complexes. *Toxicon*. 2011;57(4):555-565. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.12.019>
- Boyle J, Weitzman J, Berne C. Indications for measurement of arterial blood pH. *The American Journal of Surgery*. 1960;100(2):346-353. [https://doi.org/10.1016/0002-9610\(60\)90308-1](https://doi.org/10.1016/0002-9610(60)90308-1)
- Kaplan L, Kellum J. Fluids, pH, ions and electrolytes. *Curr Opin Crit Care*. 2010;16(4):323-331. <https://doi.org/10.1097/mcc.0b013e32833c0957>
- Al-Saleem F, Ancharski D, Ravichandran E, Joshi SG, Singh AK, Gong Y, Simpson LL. The Role of Systemic Handling in the Pathophysiologic Actions of Botulinum Toxin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2008;326(3):856-863. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.136242>

18. Fagan R, McLaughlin J, Middaugh J. Persistence of Botulinum Toxin in Patients' Serum: Alaska, 1959-2007. *J Infect Dis*. 2009;199(7):1029-1031. <https://doi.org/10.1086/597310>
19. Sheth A, Wiersma P, Atrubin D, Dubey V, Zink D, Skinner G, Doerr F, Juliao P, Gonzalez G, Burnett C, Drenzek C, Shuler C, Austin J, Ellis A, Maslanka S, Sobel J. International Outbreak of Severe Botulism with Prolonged Toxemia Caused by Commercial Carrot Juice. *Clinical Infectious Diseases*. 2008;47(10):1245-1251. <https://doi.org/10.1086/592574>
20. Delbrassinne L, Laisnez V, De Weire M, Vanderpas J, Dierick K, Denayer S. Very Long Persistence of Botulinum Toxin B in a Patient's Serum. *Open Infect Dis J*. 2018;10(1):187-191. <https://doi.org/10.2174/1874279301810010187>
21. Zhai R, Bellen H. The Architecture of the Active Zone in the Presynaptic Nerve Terminal. *Physiology*. 2004;19(5):262-270. <https://doi.org/10.1152/physiol.00014.2004>
22. Heuser J, Reese T. Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol*. 1973;57(2):315-344. <https://doi.org/10.1083/jcb.57.2.315>
23. Ahmari S, Buchanan J, Smith S. Assembly of presynaptic active zones from cytoplasmic transport packets. *Nat Neurosci*. 2000;3(5):445-451. <https://doi.org/10.1038/74814>
24. Stanley E. The calcium channel and the organization of the presynaptic transmitter release face. *Trends Neurosci*. 1997;20(9):404-409. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(97\)01091-6](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(97)01091-6)
25. Catterall W. Interactions of Presynaptic Ca^{2+} Channels and Snare Proteins in Neurotransmitter Release. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;868(1):144-159. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb11284.x>
26. Hillfiker S, Pieribone V, Czernik A, Kao H, Augustine G, Greengard P. Synapsins as regulators of neurotransmitter release. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*. 1999;354(1381):269-279. <https://doi.org/10.1098/rstb.1999.0378>
27. Hallam S, Goncharov A, McEwen J, Baran R, Jin Y. SYD-1, a presynaptic protein with PDZ, C2 and rhoGAP-like domains, specifies axon identity in *C. elegans*. *Nat Neurosci*. 2002;5(11):1137-1146. <https://doi.org/10.1038/nn959>
28. Jarvis S, Barr W, Feng Z, Hamid J, Zamponi G. Molecular Determinants of Syntaxin I Modulation of N-type Calcium Channels. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(46):44399-44407. <https://doi.org/10.1074/jbc.m206902200>
29. Taverna E, Saba E, Rowe J, Francolini M, Clementi F, Rosa P. Role of Lipid Microdomains in P/Q-type Calcium Channel (Cav2.1) Clustering and Function in Presynaptic Membranes. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;279(7):5127-5134. <https://doi.org/10.1074/jbc.m308798200>
30. Burns M, Augustine G. Synaptic structure and function: Dynamic organization yields architectural precision. *Cell*. 1995;83(2):187-194. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90160-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90160-4)
31. Simpson L. Molecular Pharmacology of Botulinum Toxin and Tetanus Toxin. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1986;26(1):427-453. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.26.040186.002235>
32. Poulain B, Lemichez E, Popoff M. Neuronal selectivity of botulinum neurotoxins. *Toxicon*. 2020;178:20-32. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.02.006>
33. Schnaar R. Gangliosides of the Vertebrate Nervous System. *J Mol Biol*. 2016;428(16):3325-3336. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.05.020>
34. Prinetti A, Roberto N, Chigorno V, Sonnino S. Glycosphingolipid behaviour in complex membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Biomembranes*. 2009;1788(1):184-193. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.09.001>
35. Bullens R, O'Hanlon G, Wagner E, Molenaar PC, Furukawa K, Furukawa K, Plomp JJ, Willison HJ. Complex Gangliosides at the Neuromuscular Junction Are Membrane Receptors for Autoantibodies and Botulinum Neurotoxin But Redundant for Normal Synaptic Function. *The Journal of Neuroscience*. 2002;22(16):6876-6884. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-16-06876.2002>
36. Jacky B, Garay P, Dupuy J, Nelson JB, Cai B, Molina Y, Wang J, Steward LE, Broide RS, Francis J, Aoki KR, Stevens RC, Fernández-Salas E. Identification of Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) as a Protein Receptor for Botulinum Neurotoxin Serotype A (BoNT/A). *PLoS Pathog*. 2013;9(5):e1003369. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003369>
37. James NG, Malik S, Sanstrum BJ, Rheume C, Broide RS, Jameson DM, Brideau-Andersen A, Jacky B. Characterization of clostridium botulinum neurotoxin serotype A (BoNT/A) and fibroblast growth factor receptor interactions using a novel receptor dimerization assay. *bioRxiv*. 2019. <https://doi.org/10.1101/718189>
38. Rummel A. Double Receptor Anchorage of Botulinum Neurotoxins Accounts for their Exquisite Neurospecificity. *Current Topics in Microbiology and Immunology Botulinum Neurotoxins*. 2013;364:61-90. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45790-0_4
39. Hernández S, Toll A, Baselga E, Ribé A, Azua-Romeo J, Pujol RM, Real FX. Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Mutations in Epidermal Nevi and Associated Low Grade Bladder Tumors. *Journal of Investigative Dermatology*. 2007;127(7):1664-1666. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700705>
40. Hafner C, Hartmann A, Vogt T. FGFR3 Mutations in Epidermal Nevi and Seboreic Keratoses: Lessons from Urothelium and Skin. *Journal of Investigative Dermatology*. 2007;127(7):1572-1573. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700772>
41. Chen J, Liu J, Zhou Y, Liu S, Liu G, Zuo Y, Wu Z, Wu N, Qiu G. Molecular therapeutic strategies for FGFR3 gene-related skeletal dysplasia. *Journal of Molecular Medicine*. 2017;95(12):1303-1313. <https://doi.org/10.1007/s00109-017-1602-9>
42. Mustafa M, Moghrabi N, Bin-Abbas B. Hypochondroplasia, Acanthosis Nigricans, and Insulin Resistance in a Child with FGFR3 Mutation: Is It Just an Association? *Case Rep Endocrinol*. 2014;2014:1-6.

55. Pirazzini M, Rossetto O, Bolognese P, Shone C, Montecucco C. Double anchorage to the membrane and intact inter-chain disulfide bond are required for the low pH induced entry of tetanus and botulinum neurotoxins into neurons. *Cell Microbiol.* 2011;13(11):1731-1743. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01654.x>
56. Galloux M, Vitrac H, Montagner C, Raffestin S, Popoff MR, Chenal A, Forge V, Gillet D. Membrane Interaction of Botulinum Neurotoxin A Translocation (T) Domain. *Journal of Biological Chemistry.* 2008;283(41):27668-27676. <https://doi.org/10.1074/jbc.m802557200>
57. Fischer A, Montal M. Crucial Role of the Disulfide Bridge between Botulinum Neurotoxin Light and Heavy Chains in Protease Translocation across Membranes. *Journal of Biological Chemistry.* 2007;282(40):29604-29611. <https://doi.org/10.1074/jbc.m703619200>
58. Pirazzini M, Azarnia Tehran D, Zanetti G, Rossetto O, Montecucco C. Hsp90 and Thioredoxin-Thioredoxin Reductase enable the catalytic activity of Clostridial neurotoxins inside nerve terminals. *Toxicon.* 2018;147:32-37. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.10.028>
59. Pirazzini M, Azarnia Tehran D, Zanetti G, Megighian A, Scorsetto M, Fillo S, Shone CC, Binz T, Rossetto O, Lista F, Montecucco C. Thioredoxin and Its Reductase Are Present on Synaptic Vesicles, and Their Inhibition Prevents the Paralysis Induced by Botulinum Neurotoxins. *Cell Rep.* 2014;8(6):1870-1878. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.017>
60. Zanetti G, Azarnia Tehran D, Pirazzini M, Binz T, Shone CC, Fillo S, Lista F, Rossetto O, Montecucco C. Inhibition of botulinum neurotoxins inter-chain disulfide bond reduction prevents the peripheral neuroparalysis of botulism. *Biochem Pharmacol.* 2015;98(3):522-530. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.09.023>
61. Fischer A, Montal M. Single molecule detection of intermediates during botulinum neurotoxin translocation across membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2007;104(25):10447-10452. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700046104>
62. Blasi J, Chapman E, Link E, Binz T, Yamasaki S, De Camilli P, Südhof TC, Niemann H, Jahn R. Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature.* 1993;365(6442):160-163. <https://doi.org/10.1038/365160a0>
63. Fernandez-Salas E, Steward L, Ho H, Garay PE, Sun SW, Gilmore MA, Ordas JV, Wang J, Francis J, Aoki KR. Plasma membrane localization signals in the light chain of botulinum neurotoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2004;101(9):3208-3213. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400229101>
64. Pozzi D, Corradini I, Matteoli M. The Control of Neuronal Calcium Homeostasis by SNAP-25 and its Impact on Neurotransmitter Release. *Neuroscience.* 2019;420:72-78. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.11.009>
65. Kasai H, Takahashi N, Tokumaru H. Distinct Initial SNARE Configurations Underlying the Diversity of Exocytosis. *Physiol Rev.* 2012;92(4):1915-1964. <https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2012>
66. Pirazzini M, Rossetto O, Eleopra R, Montecucco C. Botulinum Neurotoxins: Biology, Pharmacology, and Toxicology. *Pharmacol Rev.* 2017;69(2):200-235. <https://doi.org/10.1124/pr.116.012658>
67. Raciborska D, Trimble W, Charlton M. Presynaptic protein interactions in vivo: evidence from botulinum A, C, D and E action at frog neuromuscular junction. *European Journal of Neuroscience.* 1998;10(8):2617-2628. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00270.x>
68. Keller J, Cai F, Neale E. Uptake of Botulinum Neurotoxin into Cultured Neurons. *Biochemistry.* 2004;43(2):526-532. <https://doi.org/10.1021/bi0356698>
69. Montecucco C, Schiavo G, Pantano S. SNARE complexes and neuroexocytosis: how many, how close? *Trends Biochem Sci.* 2005;30(7):367-372. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.05.002>
70. Beske P, Scheeler S, Adler M, McNutt P. Accelerated intoxication of GABAergic synapses by botulinum neurotoxin A disinhibits stem cell-derived neuron networks prior to network silencing. *Front Cell Neurosci.* 2015;9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00159>
71. Huang X. Truncated SNAP-25 (1-197), Like Botulinum Neurotoxin A, Can Inhibit Insulin Secretion from HIT-T15 Insulinoma Cells. *Molecular Endocrinology.* 1998;12(7):1060-1070. <https://doi.org/10.1210/me.12.7.1060>
72. Meunier F, Lisk G, Sesardic D, Dolly J. Dynamics of motor nerve terminal remodeling unveiled using SNARE-cleaving botulinum toxins: the extent and duration are dictated by the sites of SNAP-25 truncation. *Molecular and Cellular Neuroscience.* 2003;22(4):454-466. [https://doi.org/10.1016/s1044-7431\(02\)00016-7](https://doi.org/10.1016/s1044-7431(02)00016-7)
73. Schiavo G, Rossetto O, Benfenati F, Poulain B, Montecucco C. Tetanus and Botulinum Neurotoxins Are Zinc Proteases Specific for Components of the Neuroexocytosis Apparatus. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;710(1):65-75. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb26614.x>
74. Simpson L, Maksymowych A, Hao S. The Role of Zinc Binding in the Biological Activity of Botulinum Toxin. *Journal of Biological Chemistry.* 2001;276(29):27034-27041. <https://doi.org/10.1074/jbc.m102172200>
75. Pantano S, Montecucco C. The blockade of the neurotransmitter release apparatus by botulinum neurotoxins. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2013;71(5):793-811. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1380-7>
76. Ashton A, Dolly J. Characterization of the Inhibitory Action of Botulinum Neurotoxin Type A on the Release of Several Transmitters from Rat Cerebrocortical Synaptosomes. *J Neurochem.* 1988;50(6):1808-1816. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1988.tb02482.x>
77. Maissey E, Wadsworth J, Poulain B, Shone CC, Melling J, Gibbs P, Tauc L, Dolly JO. Involvement of the constituent chains of botulinum neurotoxins A and B in the blockade of neurotransmitter release. *Eur J Biochem.* 1988;177(3):683-691. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb14423.x>
78. Foran P, Mohammed N, Lisk G, Nagwaney S, Lawrence GW, Johnson E, Smith L, Aoki KR, Dolly JO. Evaluation of the Therapeutic Usefulness of Botulinum Neurotoxin B, C1, E, and F Compared with the Long Lasting Type A. *Journal of Biological Chemistry.* 2002;278(2):1363-1371. <https://doi.org/10.1074/jbc.m209821200>
79. Neale E, Bowers L, Jia M, Bateman K, Williamson L. Botulinum Neurotoxin a Blocks Synaptic Vesicle Exocytosis but Not Endocytosis at the Nerve Terminal. *J Cell Biol.* 1999;147(6):1249-1260.