

Botulinum Toksini'nin Yapısı ve Etki Mekanizması

Haşmet A. Hanağası*

Botulinum Toksini (BT) insanlarda 20 yılı aşkın süreden beri güvenle kullanılmaktadır. Distoni, spastisite ve kas aşırı aktivitesi ile belirti veren diğer hastalıklarda BT yaygın olarak uygulanmaktadır. BT, nöromüsküler bileşke ve otonomik sinapslarda asetilkolin salınımını önleyerek etki eder. Toksinin yedi farklı serotipi vardır ve herbiri moleküler düzeyde spesifik aktiviteye sahiptir. Bu gözden geçirme BT'nin farmakolojisini, immünolojisini ve uygulamalarını içermektedir.

Anahtar sözcükler: botulinum toksini, SNARE proteinleri, antikor

The Structure and Mechanism of Botulinum Toxin.

Botulinum Toxin (BT) has been used safely in humans for more than 20 years. BT treatment has been used extensively for the treatment of dystonia, spasticity, other disorders in which muscle overactivity gives rise to symptoms. BT act by preventing release of acetylcholine into the neuromuscular junction and autonomic synapses. There are seven different serotypes of the toxin, each with a specific activity at the molecular level. This review includes on the pharmacology, immunology, and applications of BT.

Key words: botulinum toxin, SNARE proteins, antibody

* Doç. Dr., İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı,
Davranış Nörolojisi ve Hareket Bozuklukları Birimi, İstanbul

Giriş

Botulinum toksini (BT) tedavisinin çeşitli endikasyonlarla uygulanması son iki dekattan beri giderek artmaktadır. Nörolojik hastalıklardan kozmetiğe kadar pek çok alanda kullanılmakta olan BT ile ilgili olan bu yazıda toksinin özelliklerinden, etki mekanizmasından ve klinik uygulamada dikkat edilmesi gereken durumlardan söz edilecektir.

Tarihçe

BT ile ilgili ilk bilgiler 1700'li yıllardaki sosis zehirlenmelerine bağlı botulizm vakalarından gelmektedir.¹ Justinus Kerner 1822 yılında botulizm tablosunun klinik özelliklerini tarif etmiştir.¹ BT'nini üreten Clostridium botulinum bakterisi ilk olarak 1895 yılında Emile Pierre van Ermengem tarafından izole edilmiştir. 1940'lı yılların sonunda BT'nin nöromusküler iletiyi bloke ettiği anlaşılarak kristalize formu elde edilmiştir.² Bu tarihten sonra BT ile ilgili araştırmalar büyük ivme kazanmıştır. A. Scott, BT'ni primatlardaki strabismus tedavisi için 1960'lı yıllarda denemeye başlamıştır.² İnsanlardaki ilk uygulamalar yine strabismus tedavisi için 1970'li yılların sonunda olmuş ve bu konuyla ilgili ilk makale 1980 yılında yayınlanmıştır.³ 1983 yılından itibaren BT hemifasyal spazm, blefarospazm ve servikal distoni gibi çeşitli nörolojik hastalıklarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Son yıllarda uygulama alanı oldukça genişleyen BT'nin kullanıldığı alanlar Tablo 1'de gösterilmektedir.^{4,5}

Botulinum Toksininin Farmakolojisi

BT gram (+) anaerob bir bakteri olan Clostridium botulinum tarafından üretilir. Bilinen en güçlü nörotok-

sin olan BT'nin 1 nanogramı insanlar için öldürücü olmaya yeterlidir. BT esas olarak çinkoya bağlı bir proteaz enzimi olarak görev yapar.⁶ Toksinin hedefi hücre duvarında bulunan SNARE (soluble NSF [N-ethyl maleimide-sensitive factor] attachment protein receptor) proteinleridir.^{7,8} Hücre için hayati önem taşıyan SNARE proteinleri, plazma membranının iç yüzeyindeki veziküle nörotransmitterlerin alınmasından ve ekzositozundan sorumludur. BT, SNARE proteinlerinin bir veya birkaçını parçalayarak sinaptik aralığa asetilkolin salınımını önler ve kasta geri dönüşümlü paralizi yapar.

Clostridium botulinum toksininin 7 ayrı serotipi (A, B, C, D, E, F, G) vardır. Bunlardan A, B ve E insanlarda botulizm tablolarından sorumlu serotiplerdir. B serotipi diğerlerinden çok daha fazla otonomik etkiye sahiptir.⁶ Bu serotipler antijenik olarak ayrı, ancak yapısal ve moleküler ağırlık olarak oldukça benzer özelliktedirler. Ülkemizde ve dünyada terapötik amaçla çoğunlukla A serotipi kullanılmaktadır. B serotipi yakın zamanda Amerika ve Avrupa'da piyasaya çıkmıştır.

BT, birbirine disülfid bağıyla bağlı çift zincirden oluşan 150 kD ağırlığındaki bir polipeptittir. Bunlardan 100 kD ağırlığındaki ağır zincir C ve N terminallerinden oluşur. C terminali kolinerjik sinir terminaline affiniteden ve presinaptik reseptörlerin aracılık ettiği hücreye bağlanmadan sorumludur. N terminali ise toksinin hücre içinde yer değiştirmesini ve hafif zincirin endozomal membrana geçişini sağlar. Toksinin diğer parçası olan hafif zincir 50 kD ağırlığında olup intraselüler etki eden nörotoksin parçasını oluşturur. Bu parça membranların birleşmesinden sorumlu olan SNARE proteinlerine bağlanır ve bunları parçalar. SNARE proteinlerinin bütünlüğü ekzositoz için mutlaka gereklidir.^{6,8} Tablo 2'de BT serotipleri ve hedefleri olan SNARE proteinleri gösterilmektedir.

Tablo 1: Botulinum toksininin kullanım alanları

Fokal distoniler: Servikal distoni, blefarospazm, laryngeal distoni, ekstremitte distonisi, oro mandibular distoni, trunkal distoni, distonik tremor
Spastisite: İnme, travmatik beyin hasarı, spinal kord hasarı, serebral palsy, multipl skleroz, herediter spastik paraparezi
Strabismus
İstemsiz kas aktivitesinin eşlik ettiği distoni dışındaki hastalıklar: Hemifasyal spazm, tremor, tikler, miyokimi ve sinkinezi, miyoklonus, bruksizm, nistagmus
Lokalize kas spazmı ve ağrıları
Düz kas hiperaktivite bozuklukları: Akalazya, Hirschspung hastalığı, kronik anal fissürler, detrüsor-sfinkter dissinerjisi
Kozmetik: Hiperkinetik fasyal çizgiler,
Terleme bozuklukları: Aksiller ve palmar hiperhidroz, Frey sendromu
Diğer: Sialore, koruyucu pitoz, anismus, vaginismus

Tablo 2: Botulinum toksini serotipleri ve etkileşimi olan SNARE proteinleri

Serotip	Hedef SNARE proteini
Serotip A	SNAP 25
Serotip B	VAMP
Serotip C	Syntaksin/SNAP 25
Serotip D	VAMP
Serotip E	SNAP 25
Serotip F	VAMP
Serotip G	VAMP

SNAP-25. Synaptosome associated protein 25
VAMP: Vesicle associated membran protein (Synaptobrevin)

BT'nin nöromusküler kavşaktaki etkisi 3 basamakta özetlenebilir. Bunlar bağlanma, içeri alınma ve blokaj aşamalarıdır. Toksin ilk basamakta nöron spesifik ağır zincir parçası ile kolinerjik sinir terminallerine bağlanır. İkinci basamak olan içeri alınmada, BT reseptörlerin aracılık ettiği endositoz ile sinir terminali içine alınır ve vezikül içinde toksin formasyonu oluşur. Son basamak olan blokaj evresinde toksinin hafif zincir parçası vezikül membranını geçerek nöronal sitoplazmaya salınır ve SNARE proteinlerine bağlanarak asetilkolin salınışını yani ekzositozu bloke eder. Böylelikle BT'nin nöromusküler kavşakta etkisi ortaya çıkar.⁶⁻⁸ Yaklaşık 4-8 haftalık bir süreden sonra aksonal filizlenme ile yeni sinir terminalleri oluşur ve sinir iletimi tekrar başlar. Yapılan çalışmalarda BT-A serotipi için nöromusküler iletinin yeniden sağlanması ve asetilkolin salgılanması için geçen süre yaklaşık 91 gün olarak bulunmuştur.⁶ C serotipinin etki süresi A serotipine benzer. Diğer BT serotipleri için (B, E, F) bu süre daha kısa sürelidir. Klinik uygulamada; servikal distonide 7-10 gün, blefarospazm ve hemifasyal spazm'da 3 gün içinde etki başlar. Maksimum yarar 4.-6. haftalarda görülür ve genellikle etki 3-4 ay içinde kaybolur.

BT, asetilkolin sentezini, depolanmasını ve sinir boyunca elektriksel iletimi etkilemez. Uzun süreli BT kullanımında geri dönüşümlü denervasyon atrofisi gelişir. Yapılan deneysel hayvan çalışmalarında BT-A'nın retrograd transport yolu ile yayılarak santral sinir sistemine ulaştığı gösterilmiştir.⁹ Ancak bunun klinik öneminin ne olduğu bilinmemektedir. Yine BT uygulamalarında enjeksiyon yapılan yerin uzağındaki kaslarda tek lif EMG anormallikleri ve bazı kardiyovasküler reflekslerde bozulmalar bildirilmiştir. Bu bulguların muhtemelen küçük dozlardaki toksinin kana karışmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Benzer şekilde bu bulgularında klinikte hastalara zararlı bir etkisi şimdiye kadar gösterilememiştir. Bu etkilerinin yanında BT'nin duysal sistem üzerinde analjezik özelliği vardır.

BT aktivitesinin ölçümünde mouse unit (MU, LD50, U) birimi kullanılmaktadır. 1 mouse unit (MU) aktivitesi 18-20 gramlık Webster türü fare grubuna yapılan intraperitoneal BT enjeksiyonu ile farelerin %50'sini öldüren doz olarak tanımlanır.⁶ İnsanlarda kullanılan maksimum MU piyasada bulunan BT-A serotipi preparatlarından Dysport® için 2000, Botox®'da 400'dür.

BT-A preparatlarının dozları üretimi yapan firmaların kullandığı yöntemlere ve serotiplere göre değişir. Serotip A, Botox® ve Dysport® isimli preparat adlarıyla piyasada bulunmaktadır. Botox® A.B.D'de, Dysport® İngiltere'de üretilmektedir. Dysport®'un bir flakonunda 500MU (12,5 ng), Botox®'da 100 ünite (5ng) toksin bulunmaktadır. Yaygın olarak kullanılan bu iki preparatın dozlarını karşılaştırmak gerekirse 1MU Botox® yaklaşık 3-4MU Dysport®'a eşittir.^{10,11} Ülkemizde bulunmayan BT-B serotipi A.B.D'de Neurobloc®, Avrupa'da Myobloc® adı altında satılmaktadır. B serotipine insanlar daha az duyarlı oldukları için daha yüksek MU kullanılır. Bu nedenle BT-B yurt dışında 2500MU'den 10000MU'e kadar değişen farklı flakonlarda piyasaya sürülmüştür. Serotip F'in, BT-A'ya dirençli vakalarda kullanımıyla ilgili bazı klinik çalışmalar vardır. Ancak F serotipi piyasada bulunmamaktadır.

Yan Etkiler ve Direnç

BT uygulaması ile bazı yan etkiler ortaya çıkabilir. Yan etkilerden kaçınmak için öncelikle dikkat edilmesi gereken nokta uygulamayı yapan hekimin BT konusunda uzman ve deneyimli olmasıdır. Güvenilir ellerde BT'nin yan etki oranları oldukça düşüktür. BT'nin yan etkileri Tablo 3'te gösterilmektedir.

Uygulama yapılmadan önce dikkat edilmesi gereken durumlar vardır. Enjeksiyon yerinde infeksiyon varlığında, motor nöron hastalığı ve nöromusküler bileşke hastalığı (Myasthenia gravis, Lambert-Eaton sendromu, vb.) olanlarda, aminoglikozid gibi nöromusküler iletimi bozan ilaçlar ve antikoagülan kullananlarda BT uygulaması yapılmamalıdır.⁴ BT'nin gebelik ve laktasyonda kullanımı ile teratojen etkisi hakkında yeterli bilgi yoktur.

Tablo 3: Botulinum toksininin yan etkileri

Aşırı kas zaafı: Enjeksiyon yapılan kaslara ait, komşu kaslara ait
Komşu anatomik yapıların etkilenmesi: Disfaji (servikal distonide), punktat keratit, korneal ülserasyon, pitoz, diplopi (blefarospazm ve hemifasyal spazm)
Lokal yan etkiler: Ağrı, lokal hematoma, ağız kuruluğu, disfoni
Diğer: Döküntüler, pruritis, nezle benzeri sendrom, brakial pleksopati

Bazı durumlarda BT tedavisinin cevabı yetersiz olabilir. Bu durumda birkaç noktayı göz önüne almak gerekir. Bunlardan ilki enjeksiyon yapılan kas veya kas grubunun uygun olup olmadığıdır. Diğer bir neden ise dozun yetersiz olmasıdır. Ayrıca soğuk zincire uyulmaması sonucu toksin bozulabilir. Bazı durumlarda yan etkiler oldukça belirgin hale geldiğinden BT'nin tedavi edici etkisi maskelenebilir. BT tedavisinde cevapsızlığın en önemli nedenlerinden biri de zaman içinde toksine karşı direnç gelişmesidir.

BT'ye karşı direnç klinik cevapsızlığın gelişmesi ile birlikte toksine karşı nötralizan antikorların oluşması olarak tanımlanabilir. Sıklığı çeşitli çalışmalarda %3 ile %17 arasında değişen oranlarda bildirilmiştir.^{12,13} Toksine karşı gelişen direncin mekanizmasında toksinin ağır epitoplarına karşı oluşan antikorların neden olduğu düşünülmektedir. Genetik olarak yatkın bireylerin daha kolay direnç geliştirdiği düşünülmektedir. Servikal distoni ve spastisite gibi yüksek miktarda BT uygulanan vakalarda direnç oluşma oranı daha sıktır.¹² BT'ne karşı direnci önlemek için tedavi seanslarında gereksiz yüksek doz uygulamasından ve 3 aydan kısa süreli güçlendirici (booster) enjeksiyonlardan kaçınmak gerekir. Mümkün olan en etkili düşük dozları kullanmak uzun vadede direnç oluşma oranını minimuma indirecektir. Enjeksiyonlar arasında en az 3 ay olması gerekir. Ayrıca BT'nin denatüre olmasını önlemeye dikkat edilmelidir. Bunun için flakonu sallamadan hafifçe karıştırmak, toksini ve enjektörleri ısıdan korumak önemlidir. BT dondurucudan ya da buzdolabından alındıktan 4-8 saat içinde kullanılmalıdır.

Direnç gelişiminin anlaşılması için in-vitro ve in-vivo yöntemlerden faydalanılır. İn-vitro yöntemler Mouse-Lethal (protection, neutralization) Assay (MLA) ve ELISA'dır. Bunlardan altın standart olarak kullanılan MLA'da direnç geliştiği düşünülen hastanın serumu ile BT karıştırılarak farelere intraperitoneal olarak enjekte edilir. Toksinin enjeksiyon sonrası farelerdeki öldürücü etkisi saptanır. Bu yöntem direnç gelişimini anlamakta yararlı olmakla birlikte pratik uygulama zorluğu nedeniyle çok sık uygulanamayan bir yöntemdir.¹² Günlük pratikte daha sık olarak in-vivo yöntemler kullanılır. Bunlardan Frontalis-A testinde (FTA-T) alının bir yarı-

sına (frontal ve/veya korrugator kas) 45-60 MU Dysport® veya 15-20MU Botox® yapılır. 2-4 haftalık bekleme süresinden sonra frontal kastaki kırışıklıklarda kaybolma ve/veya kaş çatamama ortaya çıkmışsa BT'ne karşı direnç yoktur. Eğer bu uygulamadan sonra değişiklik olmamışsa direnç varlığı düşünülmelidir. Bu yöntemle benzer diğer in-vivo testler arasında ekstansör digitorum brevis testi ve sternokleidomastoideus testi sayılabilir.

BT'ne karşı direnç geliştiren hastalara yönelik bazı yaklaşımlar vardır. Toksinin elde etme metotları ve serotipleri immunolojik olarak farklı olduğundan bir serotipe direnç gösteren hasta diğerine göstermeyebilir. Dolayısıyla bir A serotipine direnç gösteren hastaya diğer A, B veya farklı serotipler uygulanabilir. Ancak Avrupa ve A.B.D'de piyasada olan B serotipi ülkemizde henüz bulunmamaktadır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalardan elde edilen bilgilerde bir serotipe direnç gösteren hastanın bir süre sonra diğer serotiplere de direnç geliştirdiği yönündedir. Unutulmaması gereken bir başka nokta ise direnç gösteren ve Ab(+) saptanan hastaların zamanla Ab (-) hale gelebileceğidir. Bu sürenin, yapılan bir çalışmada 10 ay ile 78 ay (ortalama 30 ay) arasında değiştiği bulunmuştur.¹²

Sonuç olarak BT dünyada ve ülkemizde yaygın olarak pek çok hastalığın tedavisinde başarı ile kullanılmaktadır. Ancak tedavide yarar-zarar oranını iyi saptamak ve yan etkilerden kaçınmak diğer ilaç tedavilerinde olduğu gibi büyük önem taşır. Uygulama sırasında yukarıda bahsedilen özelliklere dikkat etmek tedavi başarı oranlarında artma sağlayacaktır.

Kaynaklar

1. Erbguth FJ, Naumann M. Historical aspects of botulinum toxin: Justinus Kerner (1786-1862) and the "sausage poison". *Neurology* 1999; 53: 1850-3.
2. Carruthers A. History of the clinical use of botulinum toxin A and B. *Clin Dermatol* 2003; 21: 469-72.
3. Scott AB. Botulinum toxin injection into extraocular muscles as an alternative to strabismus surgery. *Ophthalmology* 1980; 87: 1044-9.
4. Scientific and Therapeutic aspects of botulinum toxin. (Brin MF, Hallett M, Jankovic J eds). Lippincott Williams&Wilkins. Philadelphia, 2002.
5. Jost WH, Kohl A. Botulinum toxin: evidence-based medicine criteria in rare conditions. *J Neurol* 2000; 248(suppl 1): 139-144.

6. Aoki KR. Pharmacology and immunology of botulinum toxin serotypes. *J Neurol* 2001; 248(Suppl 1): 3-10.
7. Blasl J, Chapman ER, Link E, Binz T, Yamasaki S, et al. Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature* 1993; 365: 160-3.
8. Coffield J, Considine RV, Simpson LL. The site and mechanism of action of botulinum neurotoxin. In: Jankovic J, Hallett M (eds). *Therapy with botulinum toxin*. Marcel Dekker:1994:3-13.
9. Curra A, Trompetto C, Abbruzzese G, Berardelli A. Central effects of botulinum toxin type A: evidence and supposition. *Mov Disord* 2004;19 Suppl 8: S60-4.
10. First ER, Pearce LB, Borodic G. Dose standardization of botulinum toxin. *Lancet* 1994; 343: 1035.
11. Odergen T, Hjaltason H, Kaakola S, Solders G, Hanko J, Fehling C, et al. A double blind randomized parallel group study to investigate the dose equivalence of Dysport and Botox in the treatment of cervical dystonia. *JNNP* 1998; 64: 6-12.
12. Crichfield J. Immunogenicity of botulinum toxin therapy. In: Ginsberg DJ (ed), *CNS Spectrums* 2000; 7(suppl 6): 51-58.
13. Green P, Fahn S, Diamond B. Development of resistance to botulinum toxin type A in patients with torticollis. *Movement Dis* 1994; 9: 213-17.