



Toksyna botulinowa – cudowna trucizna

Anna Mazurkiewicz-Pisarek, Andrzej Płucienniczak

Instytut Biotechnologii i Antybiotyków, Zakład Bioinżynierii, Warszawa

Clostridium botulinum toxin – a wonderful poison

Summary

Botulinum toxin is a neurotoxin protein produced by the bacterium *Clostridium botulinum*. It is one of the most poisonous, naturally occurring substances in the world and it is the most toxic protein. Although it is highly toxic, it is used in medicine.

Clinical applications of botulinum toxin, which include the treatment of overactive skeletal and smooth muscles, hypersecretory and painful disorders as well as cosmetics applications, have increased exponentially since it was first used clinically to treat strabismus more than two decades ago. This paper describes the structure, mechanism of action and application of botulinum toxin.

Key words:

Clostridium botulinum, botulinum toxin, Botox, Dysport, Myobloc.

1. Wstęp

Toksyna botulinowa, zwana również jadem kielbasianym, to neurotoksyna wytwarzana przez bakterie *Clostridium botulinum*. Jest to jedna z najbardziej trujących substancji występujących naturalnie w przyrodzie. Nauka wykorzystała jednak właściwości neurotoksyny i sprawiła, że trucizna z powodzeniem służy dzisiaj człowiekowi. Toksynę botulinową wykorzystuje się m. in. w terapii zaburzeń nerwowo-mięśniowych oraz w medycynie estetycznej.

W przyrodzie, występuje ponad sto dwadzieścia szczepów bakterii *Clostridium botulinum*. Bakteria ta, to Gram (+), przetrwalnikowa laseczka, rozwijająca się jedynie w warunkach bez-

Adres do korespondencji

Anna Mazurkiewicz-Pisarek,
Zakład Bioinżynierii,
Instytut Biotechnologii
i Antybiotyków,
ul. Starościańska 5,
02-516 Warszawa.

tlenowych i wąskim przedziale pH: 7,0-7,3. Przetrwalniki (endospory) tworzą się subterminalnie powodując charakterystyczne rozdzęcie komórki. Endospory są bardzo wytrzymałe, można je zniszczyć jedynie poprzez sterylizację. Czynnikiem wirulentnym *Clostridium botulinum* jest toksyna botulinowa, jej działanie polega na hamowaniu wydzielania acetylocholino w połączeniach nerwowo-mięśniowych, co prowadzi do paraliżu mięśni (1).

Endospory *Clostridium botulinum* występują powszechnie w glebie i mogą rozwijać się w źle przechowywanej żywności. Ponieważ toksyna może przenikać przez błonę śluzową do układu pokarmowego, do zatrucia jadem kiełbasianym dochodzi głównie drogą pokarmową. Wbrew temu co sugeruje łacińska nazwa (botulus – kiełbasa) źródłem zatruc są nie tylko przetwory (konserwy) mięsne, lecz również jarzynowe i rybne. Objawy zatrucia występują od 18 do 36 godzin po spożyciu zainfekowanego jedzenia. Do typowych symptomów zalicza się podwójne widzenie, uczucie suchości w jamie ustnej spowodowane upośledzeniem wydzielania śliny, porażenie perystaltyki jelit, zaburzenie mowy i połykania, porażenie mięśni oddechowych i w efekcie śmierć (1,2).

W zależności od szczepu bakterii rozróżnia się siedem typów toksyn botulinowych, oznaczonych kolejnymi literami alfabetu A, B, C1, D, E, F i G (3). Wszystkie są białkami składającymi się z dwóch łańcuchów, ciężkiego HC (100 kDa) i lekkiego LC (50 kDa), połączonych mostkiem disiarczkowym. Podjednostka lekka posiada właściwości proteolityczne. W zależności od typu toksyny, działanie proteolityczne skierowane jest na różne białka transbłonowe w tym, np. na białka SNARE. Wszystkie typy toksyny botulinowej posiadają podobny mechanizm działania, natomiast różnice występują w ich strukturze i stopniu toksyczności (4,5).

2. Zarys historyczny

W 1885 r. Claude Bernanrd stwierdził, że „trucizna może zabijać, albo może być również czynnikiem wykorzystywanym do leczenia chorób” (6).

Bakteria *Clostridium botulinum* po raz pierwszy została wyizolowana w 1895 r. przez belgijskiego prof. Emila van Ermengena, natomiast w roku 1944 Edward Schantz jako pierwszy uzyskał toksynę botulinową w formie krystalicznej (7). W latach 60. XX w. dr Alan Scott jako pierwszy rozpoczął testowanie toksyny botulinowej typu A na małpach. Rezultaty były obiecujące, wstrzyknięcie niewielkiej dawki toksyny do nadaktywnych mięśni oka doprowadziło do znacznego rozluźnienia kurczu powiek u testowanych zwierząt. Na podstawie testów wykazano, że jad kiełbasiany jest skuteczny również w leczeniu zęza (8). W 1988 r. mała firma farmaceutyczna Allergan, produkująca m.in. soczewki kontaktowe, odkupiła od dra Alana Scotta prawa do sprzedaży toksyny botulinowej typu A, produkowanej wówczas pod nazwą Oculinum. Firma zmieniła wkrótce nazwę handlową na Botox i rozszerzyła zakres badań nad klinicznym zastosowaniem toksyny (9). W 1989 r. Amerykań-

ska Agenda ds. Żywności i Leków (ang. *US Food and Drug Administration*) wydała firmie Allergan licencję na produkcję Botoxu w celach terapeutycznych (kurcze powiek, zez, przykurcze, spastyczność mięśni) u osób powyżej 12 roku życia. W 2000 r. FDA pozwoliło na stosowanie toksyny botulinowej w przypadku dystonii szyjnej oraz jako środek przeciwbólowy, a w 2002 r. w medycynie kosmetycznej w celu zredukowania zmarszczek (9-11,22).

3. Organizacja locus toksyny botulinowej typu A w genomie *Clostridium botulinum*

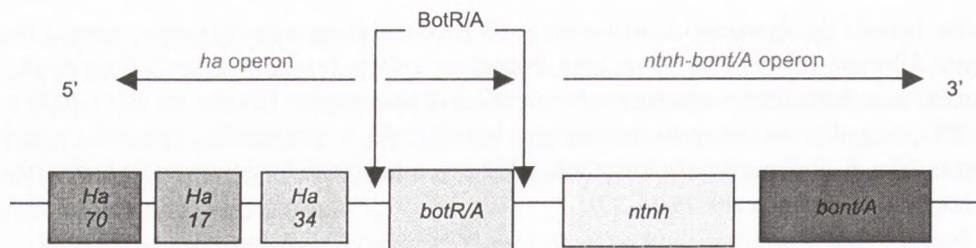
W 2003 r. opisano sekwencję genetyczną kompleksu tworzącego toksynę botulinową typu A. Zsekwencionowano sześć otwartych ramek odczytu kodujących gen *BoNT*, geny kodujące białka nietoksyczne tzw. białka asocjujące HA70, HA17, HA34, NTNH oraz gen kodujący białko botR/A (12). Szczegółowe informacje dotyczące sekwencji nukleotydowej oraz sekwencji aminokwasowej białek wchodzących w skład kompleksu neurotoksyny podano w tabeli 1.

Tabela 1

Dane dotyczące białek wchodzących w skład kompleksu neurotoksyny botulinowej typu A (12)

Gen neurotoksyny	Geny dla białek nietoksycznych	Długość genu (pz)	Liczba aminokwasów	Masa (kDa)	Numer GenBank
<i>BoNT</i> (LC+HC)		3886	1296	149,4	AF488749
	<i>NTNH</i>	3581	1193	138,2	AF488748
	<i>HA70</i>	1881	625	71,1	AF488747
	<i>HA17</i>	440	147	17,0	AF488745
	<i>HA34</i>	881	291	33,8	AF488746
	<i>BotR/A</i>	536	178	21,7	AF488750

Geny kodujące toksynę botulinową i białka nietoksyczne tworzą klaster genów nazywany locus botuliny. Jest on prawdopodobnie położony w obrębie ruchomego elementu genetycznego, który w zależności od rodzaju szczepu występuje w różnych miejscach w genomie (typ G na plazmidzie, typ C i D na bakteriofagu, typ A, B, E, F na chromosomie). Na rysunku 1 przedstawiono genetyczną organizację genów neurotoksyny botulinowej typu A (13,14).



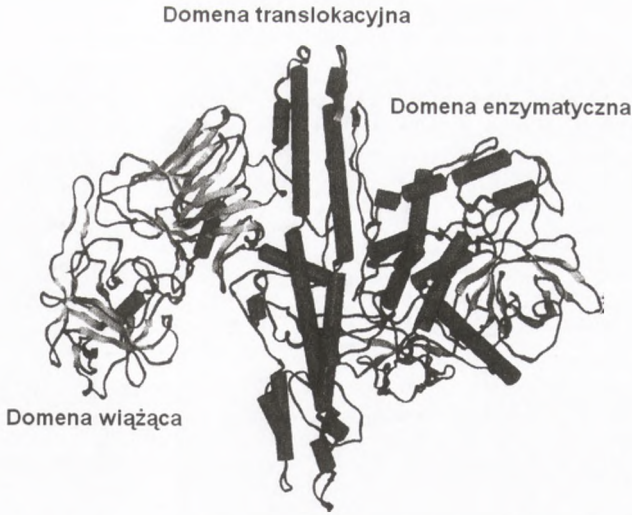
Rys. 1. Schemat przedstawiający klaster genów kodujących toksynę botulinową typu A oraz białka nietoksyczne i białko BotR/A (13). Gen *bont/A* jest zlokalizowany na 3' końcu locus i jest poprzedzony genem *ntnh* (ang. *non-toxic-non-hemagglutinin*). Geny *ntnh* i *bont* są transkrybowane w tym samym kierunku. Geny hemaglutyniny (*ha70*, *ha17*, *ha34*) są zlokalizowane na 5' końcu i są transkrybowane w przeciwnym kierunku. Gen *botR* jest zlokalizowany pomiędzy operonem *ntnh-bont/A* i operonem *ha*.

Geny neurotoksyny i białek nietoksycznych tworzą dwa policystronowe operony (operon *ntnh-bont/A* i operon *ha*), transkrybowane w przeciwnych kierunkach. Rozdzielone są one genem kodującym białko *botR/A*, które jest regulatorem wzmacniającym ekspresję genów botuliny. Omawiany locus toksyny botulinowej występuje w genomie tylko w jednej kopii (15-17).

4. Struktura toksyny botulinowej

Potwierdzenie struktury krystalicznej toksyny botulinowej w laboratorium prof. Raymonda Stevensa było podstawowe w rozumieniu mechanizmu działania neurotoksyny. Struktura dużego białka o masie 150 kDa jest płaska i modułowa (składa się z modułów/domen), dzięki czemu posiada wyjątkowy potencjał i selektywność neuronową. Toksyna składa się z trzech domen: 1) wiążącej (C-koniec łańcucha ciężkiego), 2) translokacyjnej (N-koniec łańcucha ciężkiego) oraz 3) enzymatycznej (łańcuch lekki) z wysoce specyficzną aktywnością endopeptydazy do przecinania białek zaangażowanych w uwalnianie neurotransmiterów (rys. 2). Domeny różnią się od siebie strukturalnie, natomiast domena enzymatyczna otoczona jest pętlą. Domeny mogą działać niezależnie od siebie, cecha ta stwarza wiele możliwości do tworzenia inhibitorów neurotoksyny (23).

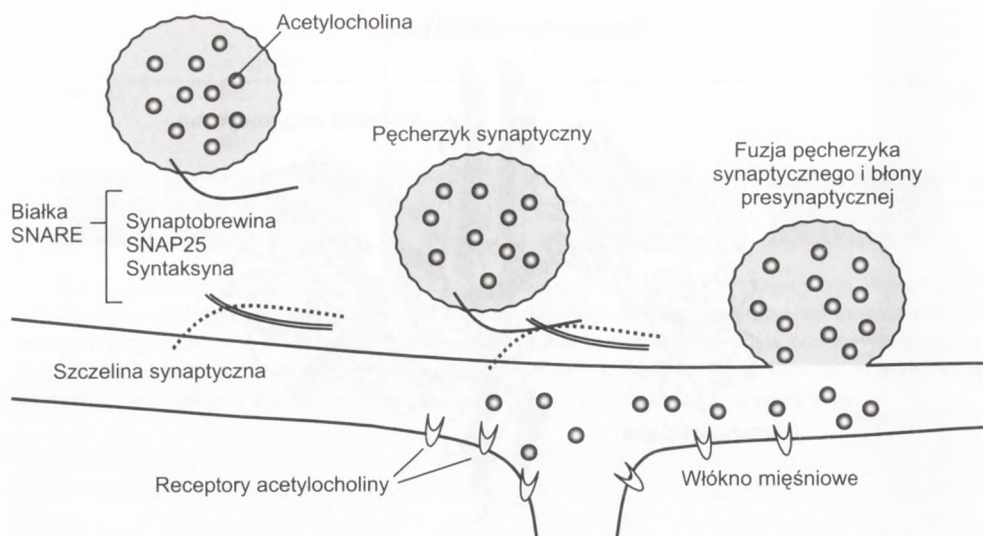
Poznanie struktury oraz modelu cząsteczkowego stworzyło możliwość zaprojektowania antidotum przeciwko botulizmowi. Dowiedziono, że zablokowanie którejkolwiek z domen może zahamować funkcję toksyny botulinowej. Ludzkie przeciwciała monoklonalne, małe peptydy i małe cząsteczki wpływające na aktywność endopeptydazy zostały uznane za potencjalne nowe inhibitory. Szczegółowe informacje dotyczące strategii projektowania inhibitorów neurotoksyny *Clostridium botulinum* zamieszczone są w pracy S. Cai i B.R. Singh z 2007 r. (18).



Rys. 2. Krystaliczna struktura toksyny botulinowej typu A (3-D) z zaznaczonymi trzema domenami: 1) wiążącą, 2) translokacyjną i 3) enzymatyczną (23).

5. Mechanizm działania toksyny botulinowej

Złącze nerwowo-mięśniowe to synapsa znajdująca się pomiędzy neuronem ruchowym i włóknem mięśniowym. U zdrowego człowieka impuls nerwowy docierający do synapsy nerwowo-mięśniowej powoduje otwarcie bramkowanego napięciem kanałów wapniowych obecnych w błonie presynaptycznej. Wnikanie jonów wapnia do wnętrza neuronu poprzez otwarte kanały powoduje fuzję pęcherzyków synaptycznych z błoną presynaptyczną i uwolnienie acetylocholinę do szczeliny synaptycznej. Acetylocholina dyfunduje poprzez szczelinę i wiąże się z mięśniowym receptorem acetylocholinę, powodując depolaryzację sarkolemy i powstanie potencjału czynnościowego, który przemieszcza się wzdłuż komórki mięśniowej, wywołując skurcz mięśnia. Warunkiem niezbędnym do połączenia pęcherzyków synaptycznych z błoną komórkową neuronu i uwolnienia przekaźnika nerwowego na zewnątrz komórki jest obecność kilku białek transbłonowych (SNARE), tworzących kompleks fuzyjny. Należą do nich syntaksyna, synaptobrewina (VAMP2) oraz białko SNAP 25. Syntaksyna wraz z przyłączonym do niej białkiem SNAP 25 umiejscowiona jest w presynaptycznej błonie komórkowej, natomiast synaptobrewina jest zakotwiczona w błonie pęcherzyka poprzez pojedynczą helisę transbłonową, większa jej część znajduje się po stronie cytozolowej, gdzie dostępna jest dla białka SNAP 25. Powstanie kompleksu białkowego umożliwia zbliżenie się pęcherzyka do błony komórkowej na odległość optymalną dla połączenia się błon oraz uwolnienie acetylocholinę do przestrzeni presynaptycznej, co powoduje przekazanie impulsu nerwowego do mięśni, a w konsekwencji ich skurcz (19) (rys. 3).



Rys. 3. Mechanizm przekazywania impulsu nerwowego z synapsy do mięśni. Powstanie kompleksu białkowego składającego się z białek SNARE (Synaptobrewina, Syntaksyna, SNAP 25), umożliwia zbliżenie się pęcherzyka synaptycznego do błony presynaptycznej na optymalną odległość. Fuzja pęcherzyków z błoną powoduje uwolnienie acetylocholin do szczeliny synaptycznej, co powoduje przekazanie impulsu nerwowego do mięśnia.

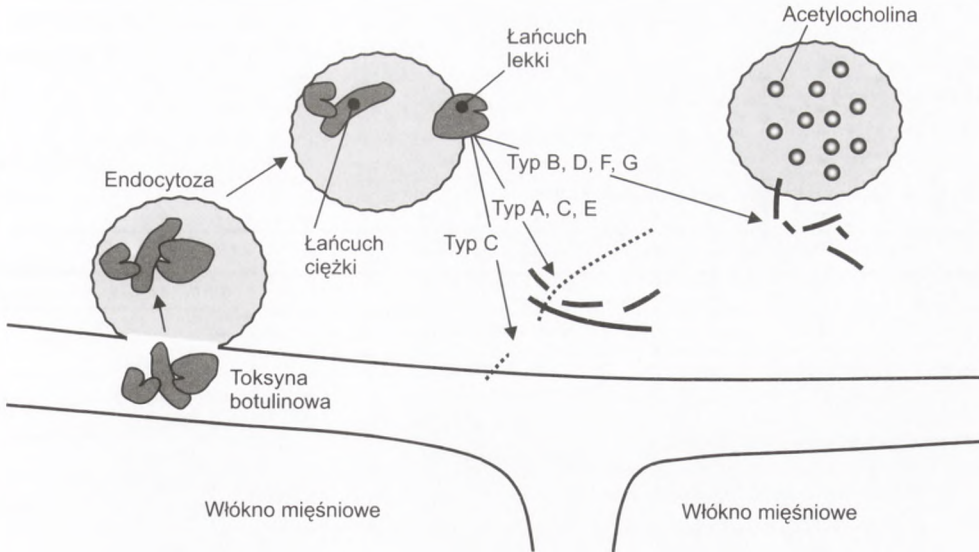
W przypadku gdy toksyna botulinowa dostanie się do organizmu jest wchłaniana w jelitach i poprzez endocytozę przenika do układu krwionośnego i limfatycznego. Następnie wnika do naczyń krwionośnych wskutek nierozpoznanego dotychczas mechanizmu, przedostaje się do przestrzeni międzykomórkowej, gdzie oddziałuje z cholinergicznymi komórkami nerwowymi.

Niezależnie od typu toksyny botulinowej mechanizm działania każdej z nich jest podobny i można go sprowadzić do trzech głównych etapów (rys. 4).

W pierwszym etapie neurotoksyna wiąże się z błoną presynaptyczną neuronu poprzez specyficzne oddziaływania pomiędzy domeną wiążącą łańcucha ciężkiego a receptorami znajdującymi się na powierzchni komórki.

W drugim etapie toksyna przenika do wnętrza zatrutej komórki, tworzy się pęcherzyk synaptyczny, po czym cząsteczka toksyny jest wchłaniana do wnętrza neuronu na drodze endocytozy. Następnie neurotoksyna opuszcza pęcherzyk (endosom) i przedostaje się do cytoplazmy komórki. Na skutek działania pomp protonowych w błonie endosomu następuje stopniowe obniżenie pH. Uważa się, że w pH 5,5 i niższym następuje zmiana konformacji toksyny, która prowadzi do ekspozycji reszt hydrofobowych i umożliwia toksynie botulinowej osadzenie się na membranie synaptycznej.

W ostatnim etapie następuje redukcja mostku disiarczkowego łączącego łańcuch ciężki i łańcuch lekki neurotoksyny. Łańcuch lekki staje się metaloproteazą



Rys. 4. Mechanizm działania toksyny botulinowej. Toksyna botulinowa wiąże się z błoną presynaptyczną i przenika do wnętrza zatrutej komórki, tworzy się pęcherzyk synaptyczny. W drugim etapie następuje redukcja wiązania disiarczkowego łączącego łańcuch ciężki i łańcuch lekki neurotoksyny. Łańcuch lekki staje się metaloproteazą, której celem działania są białka transbłonowe SNARE. Degradacja któregośkolwiek z tych białek uniemożliwia połączenie się pęcherzyka synaptycznego z błoną presynaptyczną i uwolnienie acetylocholino do przestrzeni międzykomórkowej (19).

(w centrum katalicznym podjednostki występuje jon cynku), której celem działania są białka transbłonowe SNARE. Degradacja któregośkolwiek z tych białek, uniemożliwia połączenie się pęcherzyka synaptycznego z błoną presynaptyczną i uwolnienie acetylocholino do przestrzeni presynaptycznej. Zablockowanie przekazywania impulsu nerwowego do mięśni powoduje długotrwałe rozluźnienie mięśni (20-22).

Wraz ze szczegółowym zrozumieniem mechanizmu działania toksyny botulinowej, powstało wiele nowych możliwości uzyskiwania inhibitorów i antydotum przeciwko botulizmowi. Inhibitory mogą hamować działania toksyny na każdym z trzech etapów: wiązanie do błony presynaptycznej, endocytozę, translokację, działanie proteazy, jak również mogą neutralizować toksyny w środowisku zewnątrzkomórkowym (18).

Jakkolwiek wszystkie typy toksyny botulinowej hamują wydzielanie acetylocholino do przestrzeni synaptycznej, to każda z nich oddziałuje w inny sposób na białka typu SNARE. Przykładowo, toksyny botulinowe typu A i E degradują 25 kDa białko SNAP 25, ale każda z toksyn w innym docelowym miejscu cięcia. Typy B, D, F i G oddziałują z białkiem VAMP, przycinając je w zależności od typu w różnych miejscach. Toksyna botulinowa typu C może degradować zarówno syntaksynę jak i białko SNAP 25 (4,23).

W tabeli 2 przedstawiono poszczególne typy toksyny botulinowej, białka na które skierowane jest działanie proteolityczne oraz docelowe miejsca cięcia dla poszczególnych typów neurotoksyny.

Tabela 2

Działanie proteolityczne toksyn botulinowych (23)

Typ toksyny botulinowej	Degradowane białko	Miejsce cięcia
A	SNAP-25	Gln197-Arg198
B	VAMP/Synaptobrevina	Gln76-Phe77 Gln59-Phe60?
C1	Syntaksyna 1A, 1B SNAP-25	Lys253-Ala254 Lys252-253
D	VAMP/Synaptobrevina	Lys59-Leu60 Ala67-Asp68 Lys42-Leu43?
E	SNAP-25	Arg180-Ile181
F	VAMP/Synaptobrevina	Gln58-Lys59 Gln41-Lys42?
G	VAMP/Synaptobrevina	Ala81-Ala82

Zaprezentowane uprzednio różnice w mechanizmie działania toksyny botulinowej, w zależności od serotypu, wpływają na siłę i czas działania w organizmie.

Najbardziej toksycznym naturalnym czynnikiem biologicznym poznanym przez człowieka jest typ A toksyny botulinowej i to właśnie on jest wykorzystywany praktycznie. Toksyna botulinowa typu A jest 1,8 mld razy bardziej zabójcza od dyfterytu, 30 mln razy bardziej niż jad kobry, 12 mln razy bardziej niż toksyna wytwarzana przez *Vibrio cholerae* (24). Aktywność oznacza się poprzez wskaźnik LD₅₀, (po podaniu 0,05 ng neurotoksyny typu A ginie 50% myszy płci żeńskiej z gatunku Swiss Webster o wadze 18-20 g każda). Przyjęto, że 1U jest to ilość toksyny określona przez wskaźnik LD₅₀ (24).

W medycynie wykorzystuje się również toksynę botulinową typu B, jest ona jednak 500 razy mniej toksyczna od toksyny botulinowej typu A (25).

6. Zastosowania toksyny botulinowej

Toksyna botulinowa typu A i B jest produkowana pod trzema nazwami handlowymi (26):

1) BOTOX – (kompleks neurotoksyny botulinowej typu A + albumina + NaCl); firma Allergan, Irvine, California; produkowany jako liofilizat;

2) **DYSPORT** – (kompleks neurotoksyny botulinowej typu A + albumina + laktoza); firma Ipsen Limited, Berkshire, Wielka Brytania; produkowany jako proszek do sporządzenia roztworu;

3) **MyoBloc** – (toksyna botulinowa typu B + albumina + NaCl + bursztynian sodu); firma Eian Corporation, Dublin, Irlandia; produkowany jako roztwór do iniekcji.

Botulina to obecnie niezastąpiony czynnik terapeutyczny stosowany w leczeniu zaburzeń nerwowo-mięśniowych, jest wykorzystywana również przy uśmierzaniu bólu, nadpotliwości oraz w schorzeniach układu pokarmowego (27-29).

Dysfunkcje, przy których można stosować toksynę botulinową:

- dystonia szyjna, tiki nerwowe, drżenie samoistne rąk, przykurcze twarzy, bruksizm, drgania włókienkowe mięśni, drgawki, różne formy epilepsji (27-31);

- spastyczność mięśni, przykurcze (27,28);

- zaburzenia hipersekrecyjne: nadpotliwość dłoni i stóp, zespół nerwu uszno-skroniowego (27,28,32);

- zaburzenia oczu: zez (zbieżny, rozbieżny), oczopląs, oscylopsja, opadanie powieki, kurcze powieki, podwinięcie powieki (27,28,33);

- bóle głowy, migrena, nerwobóle, bóle pleców (27,28,34,35);

- zaburzenia układu pokarmowego: zaparcia, zatwardzenia, skurcze dolnej części przełyku, otyłość (27,28,36);

- jękanie, problemy ze strunami głosowymi, drżenie głosu (27-29);

W 2002 r. botulina stała się alternatywą dla chirurgii plastycznej i zaczęła być wykorzystywana w kosmetologii do usuwania zmarszczek (poziome bruzdy na czole, bruzdy pionowe, asymetria brwi, podnoszenie brwi, „kurcze łapki”, zmarszczki mimiczne). Ból podczas zabiegu jest niewielki, dlatego nie ma potrzeby stosowania znieczulenia. Efekt jest widoczny już po sześciu godzinach od iniekcji i utrzymuje się przez około sześć miesięcy. Toksyna jest podawana jako miejscowy czynnik paraliżujący i działa jedynie w obrębie mięśni, do których została wstrzyknięta.

Właściwości toksyny botulinowej starano się wykorzystać również do produkcji broni biologicznej. Badania nad użyciem botuliny w celach militarnych rozpoczęto już kilkadziesiąt lat temu w Japonii, Związku Radzieckim oraz w Stanach Zjednoczonych. Nadal prowadzone są w kilku krajach. Toksyna botulinowa może wnikać przez błonę śluzową układu oddechowego (1 gram toksyny, która poprzez inhalację dostaje się do krwiobiegu może zabić 1,5 mln ludzi). W pierwszej połowie lat dwudziestych XX w. japońska sekta Aum Shinrikyo kilkakrotnie próbowała rozpylić toksynę w centrum Tokio, istnieje jednak trudność w przeprowadzeniu jej w stan aerozolu ponieważ jest szybko degradowana w powietrzu, dlatego żaden z ataków nie powiódł się (39).

7. Podsumowanie

Kliniczne zastosowanie toksyny botulinowej typu A, jednego z serotypów neurotoksyny *Clostridium botulinum*, reprezentuje jedną z najdynamiczniej rozwijających się gałęzi w nowoczesnej medycynie. Substancją będącą potencjalną trucizną wykorzystano jako czynnik terapeutyczny. Botulina stała się również popularnym środkiem powszechnie stosowanym w celu poprawienia urody. Ilość patentów, w których opisuje się nowe zastosowania neurotoksyny w celach terapeutycznych dowodzi, że coraz częściej wypiera ona konwencjonalne metody leczenia.

W prezentowanej pracy skupiono się na strukturze, mechanizmie działania i zastosowaniu toksyny botulinowej. Pominięto natomiast tematykę związaną z produkcją, informacje na ten temat są opisane szczegółowo w patentach (40,41).

Obecnie toksyna botulinowa uzyskiwana jest z hodowli bakterii *Clostridium botulinum*, następnie kompleks neurotoksyny jest oczyszczany poprzez szereg precipitacji aż do uzyskania krystalicznego, aktywnego kompleksu. Jednak ostatnie doniesienia naukowe, świadczą o tym, że uzyskano już rekombinowaną genetycznie botulinę. W patencie (42) z roku 2006 opisano konstrukcje wektorów, mających na celu uzyskanie jak najwyższej ekspresji genu kodującego toksynę botulinową typu A, jednak aby wykorzystać rekombinowaną genetycznie botulinę w praktyce potrzeba jeszcze wielu badań. Jaki będzie efekt końcowy, okaże się na pewno w niedalekiej przyszłości.

Literatura

1. Brock T., Madigan M., Martinko J., Parker J., (1997), *Biology of Microorganism*, Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, New Jersey, 802-803.
2. Aoki K. R., (2001), *Journal Neurol.*, 248 (Suppl.1), 3-10.
3. Henderson I., Davis T., Elmore M., Minton N., (1997), *The genetic basis of toxin production in Clostridium botulinum and Clostridium tetani. Molecular Biology and Pathogenesis*, Academic Press, San Diego, 261-294.
4. Aoki K. R., Guyer B., (2001), *Eur. J. Neurol.*, 8 (Suppl.5), 21-29.
5. Brin M. F. H. M., Jankovic J., (2002), *Scientific and Therapeutic Aspects of Botulinum Toxin*, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
6. Bernard C., (1927), *An Introduction to the Study of Experimental Medicine*, New York.
7. Erbguth F. J., (2004), *Mov. Dis.*, 19, 2-6.
8. Johnsons E., (1999), *Annu. Rev. Microbiol.*, 53, 551-575.
9. Schantz E. J., Johnson E. A., (1997), *Perspect. Biol. Med.*, 40, 317-327.
10. Binder W. J., Brin M. F., Blitzer A., Pogoda J. M., (2002), *Dis. Mon.*, 48, 323-335.
11. Erbguth F., Naumann M., (1999), *Neurology*, 53, 1850-1853.
12. Zhang Li., Wei-Jen Lin., Shengwen Li, Aoki R., (2002), *Gene*, 315, 21-32.
13. Raffestin S., Marvaud J. C., Cerrato B., Popoff M. R., (2004), *Anaerobe*, 10, 93-100.
14. Franciosa G., Pourshaban M., (2004), *App. Env. Microbiol.*, 70, 4170-4176.
15. Jovita M. R., Collins M. D., East A. K., (1998), *Cur. Microbiol.*, 36, 226-231.
16. Fujinaga Y., Takeshi K., Inoue K., Fujita R., Ohyama T., Moriishi K., Oguma K., (1995), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 213, 737-745.

17. Lin W. J., Johnson E. A., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 4441-4447.
18. Cai S., Singh B. R., (2007), *Infectious Disorders-Drug Targets*, 7, 47-57.
19. Arnon S., et al., (2001), *JAMA*, 285, 1059-1070.
20. Simpson L., (2004), *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 44, 167-193.
21. Burgen A. S., Dickens F., Zatman L. J., (1949), *Journal Physiol.*, 109, 10-24.
22. Dressler D., Saberi F. A., Barbarosa E. R., (2005), *Arq. Neuropsiquiatr.*, 63, 180-185.
23. Aoki K. R., (2004), *Curr. Med. Chem.*, 11 (23), 3085-3092.
24. Singh B. R., (1996), *Critical Aspects of Bacterial Protein Toxins*, 63-84 (chapter 4) of *Natural Toxins II*, Plenum Press, New York.
25. Moyer E. D., et al., (1994), *Botulinum toxin type B: Experimental and Clinical Experience*, 71-85 (chapter 6) of *Therapy With Botulinum Toxin*, Informa Healthcare.
26. US Patent: Application number: 10/288, 906.
27. Jankovic J., (2004), *Jour. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 75, 951-957.
28. Scott A. B., (2004), *Dermatol. Clin.*, 22, 131-133.
29. Thakker M. M., Rubin P., (2004), *Int. Ophthalmol. Clin.*, 44, 147-163.
30. Brin M. F., Fahn S., Moskowitz C., et al., (1987), *Mov. Disord.*, 2, 237-254.
31. Truong D., et al., (2005), *Efficacy and Safety of Botulinum Type A Toxin (Dysport) in Cervical Dystonia: Results of the First US Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Study*.
32. Ponce-Olivera R. M. et al., (2006), *Dermatol. Online Journal*, 12, 9.
33. Scott A. B., (1980), *Jour. Pediatr. Ophthalmol. Strabismus.*, 17, 21-25.
34. Cui M., Khanijou S., Rubino J., Aoki K. R., (2004), *Pain*, 107 (1-2), 125-133.
35. Binder W., Brin M. F., Blitzer A., Schenrock L., Diamond B., (1998), *Mov. Disord.*, 13, 241.
36. Jost W. H., Schimirigk K., (1994), *Dis. Colon. Rectum.*, 37, 1321-1324.
37. Rohrich R. J., Janis J. E., Fagien S., Stuzin J. M., (2003), *CME Plast. Reconstr. Surg.*, 112, 177-187.
38. Wolina U., Konrad H., Petersen S., (2005), *Jour. Cosmet. Dermatol.*, 4, 223-227.
39. Bossi P., Tegnell A., Baka A., van Loock F., Hendriks J., Werner A., Maidhof H., Gouvras G., (2004), *Eurosurveillance*, 9, 1-4.
40. Sakaguchi G., Shimizu T., (1994), Publication info.: GB2272697.
41. Jung Hyeon Ho, Woo Hui Dong, (2003), Publication info. KR200330030060150.
42. Miller R., Aoki K. R., (2006), Publication info. CA2575994.