

Antidepressive effect of botulinum neurotoxin injection

Przeciwdepresyjne działanie iniekcji toksyny botulinowej

Marek Krzystanek¹, Roman Wojnar¹, Rafał Skowronek², Ewa Martyniak¹,
Artur Pałasz³



Received 23.01.2016
Accepted 28.07.2016

AFFILIATIONS / AFILIACJE

- 1 Śląski Uniwersytet Medyczny, Katedra Psychiatrii i Psychoterapii, Klinika Rehabilitacji Psychiatrycznej, Katowice
- 2 Śląski Uniwersytet Medyczny, Katedra Medycyny Sądowej i Toksykologii Sądowo-Lekarskiej, Katowice
- 3 Śląski Uniwersytet Medyczny, Katedra Histologii i Embriologii, Zakład Histologii, Katowice

KEYWORDS

- botulinum neurotoxin A
- depression
- treatment of depression

SŁOWA KLUCZOWE

- botulina A
- depresja
- leczenie depresji

CORRESPONDENCE ADDRESS / ADRES DO KORESPONDENCJI

Marek Krzystanek
Klinika Rehabilitacji Psychiatrycznej
Katedra Psychiatrii i Psychoterapii
ul. Ziołowa 45, 40-635 Katowice
phone: +48 32 205 92 60
email: krzystanekmarek@gmail.com

ABSTRACT

The aim of this paper is to review the literature regarding a new method of the treatment of depression, in which a single dose of botulinum neurotoxin A is injected into the glabellar lines. The authors discuss the structure and mechanism of the effect of botulinum, along with the risk and symptoms of poisoning and the applications of botulinum in medicine. Five publications are reviewed, one of them involving a series of case studies and four reporting on clinical trials, in which botulinum A was administered to patients with moderate or severe depression. All trials demonstrate a significant antidepressive effect of botulinum A, injected in the glabellar region. This allows for the conclusion that botulinum A injection in the glabellar region is an effective and durable treatment for depression.

STRESZCZENIE

Celem pracy był przegląd piśmiennictwa dotyczący nowej metody leczenia depresji – jednorazowej iniekcji botuliny w bruzdy okolicy gładziny czoła. W artykule omówiono budowę i mechanizm działania botuliny, ryzyko i objawy zatrucia oraz zastosowania botuliny w medycynie. Szczegółowo przedstawiono pięć publikacji obejmujących jedną serię przypadków oraz cztery badania kliniczne z podawaniem botuliny A osobom chorującym na depresję. Wszystkie badania wskazują na istotny efekt przeciwdepresyjny iniekcji botuliny A wstrzykiwanej w okolice gładziny czoła. Jednorazowe wstrzyknięcie botuliny A w okolice bruzd gładziny czoła jest skutecznym i trwałym sposobem leczenia depresji.

Wstęp

Spośród metod leczenia depresji znanych we współczesnej psychiatrii dwie są szczególnie niezwykle – leczenie toksyną botulinową i leczenie ketaminą. Cechą, która je obie wyróżnia, jest trwałość efektu po jednorazowym podaniu środka leczniczego. W przypadku ketaminy efekt przeciwdepresyjny może utrzymywać się ponad tydzień, a efekty leczenia toksyną botulinową mogą trwać miesiącami (Young 2013).

W ostatnich latach wysunięto oryginalną i ciekawą hipotezę, mówiącą, iż podawanie toksyny botulinowej do mięśni związanych z martwieniem się i negatywnymi emocjami może mieć działanie przeciwdepresyjne. Jako miejsce związane z działaniem przeciwdepresyjnym toksyny botulinowej wskazywano okolice zmarszczek na gładziźnie czoła. Iniekcje wykonuje się w mięsień marszczący brwi i mięsień podłużny nosa. Interesujące, że ta – wydawałoby się ryzykowna – teza o asocjacji stanu emocjonalnego z jego ekspresją mimiczną doczekała się wielu badań i dowodów naukowych wskazujących istotnie na przeciwdepresyjne działanie toksyny botulinowej.

Autorzy postanowili przedstawić współczesny stan wiedzy na temat toksyny botulinowej, opisać jej pozycję terapeutyczną w pozapsychiatrycznych dziedzinach medycyny oraz dokonać przeglądu, ich zdaniem, najważniejszych publikacji dotyczących zastosowania toksyny botulinowej w terapii depresji.

Botulina (toksyna botulinowa, jad kiełbasiany)

Neurotoksyna botulinowa (BoNT), popularnie zwana toksyną botulinową, jest białkiem syntezowanym przez Gram-ujemne beztlenowe, wytwarzające spory bakterie rodzaju *Clostridium sp.* Występuje w formie siedmiu serologicznie odmiennych typów (BoNT/A-G), z których każdy zawiera liczne izoformy (Popof i Bouvet 2013). Większość dostępnych w piśmiennictwie medycznym badań dotyczy neurotoksyny typu A (BoNT/A) produkowanej przez rozpowszechniony gatunek *Clostridium botulinum*. Cechą wspólną wszystkich wariantów strukturalnych cząsteczki BoNT jest obecność dwóch łańcuchów: L (lekkiego, 50 kDa) i H (ciężkiego 100 kDa), połączonych specyficznym mostkiem dwusiarczkowym (Swaminathan i Eswaramoorthy 2000; Montal 2010). Klasycznym miejscem działania toksyny są kompleksy białkowe błony presynaptycznej oraz pęcherzyków egzocytarnych realizujące proces uwalniania neurotransmiterów, zwłaszcza acetylocholinę w złączach nerwowo-mięśniowych (Blasi i wsp. 1993).

Mechanizm działania toksyny botulinowej na połączenia synaptyczne jest wieloetapowy i ściśle związany z aktywnością określonych domen molekularnych jej cząsteczki. Pierwszym etapem jest przyłączenie C-terminalnego fragmentu łańcucha H do niezidentyfikowanego do tej pory receptora błony presynaptycznej. Jego

konsekwencją jest internalizacja cząsteczki toksyny do wnętrza pęcherzyków synaptycznych (Colasante i wsp. 2013). Kolejną fazę stanowi translokacja katalitycznej podjednostki L w błonie pęcherzyka przy udziale N-terminalnej domeny łańcucha H. Ostatecznie następuje redukcja wiązań dwusiarczkowych, uwolnienie wykazującego aktywność metaloproteinazy łańcucha L do neuroplazmy i jego wysoce selektywny atak na jedno z trzech białek SNARE: SNAP-25, synaptobrewinę (VAMP) lub syntaksynę (Rossetto i wsp. 2015). Proteoliza wymienionych białek neuronalnych uniemożliwia prawidłowe dokowanie i fuzję pęcherzyków synaptycznych i w praktyce trwale blokuje działanie synapsy.

Sugerowane jest również istnienie alternatywnych mechanizmów wewnątrzkomórkowego działania cząsteczek BoNT, niezwiązanego z inhibicją białek kompleksu fuzyjnego. Zaobserwowano, że BoNT/A może hamować uwalnianie kwasów arachidonowego oraz lizofosfatydowego (LPA), błonowych czynników promujących uwalnianie neurotransmiterów (Ray i wsp. 1993; Ishida i wsp. 2004; Matak i Lacković 2015). Postulowany jest również udział BoNT/A w regulacji procesu powstawania i elongacji zakończeń aksonalnych (neurytogenezie) nerwów ruchowych (Morbiato i wsp. 2007; Harrison i wsp. 2011). Niewykluczone, że BoNT/A może być również modulatorem ekspresji szeregu istotnych funkcjonalnie genów komórek nerwowych. Ludzkie neurony glutaminergiczne i GABA-ergiczne poddane *in vitro* 14-dniowemu działaniu BoNT/A ujawniły istotne zmiany ekspresji licznych genów, zwłaszcza tych związanych ze wzrostem neurytów i wrażliwością kanałów wapniowych (Scherf i wsp. 2104, Matak i Lacković 2015). Istnieją też doniesienia, że BoNT/A modyfikuje ekspresję genów wybranych neuropeptydów, m.in. enkefalinę, galaninę, substancji P i neurotensyny neuronów rdzenia kręgowego oraz obwodowych zwojów autonomicznych *in vivo* (Humm i wsp. 2000; Bossowska i wsp. 2015). Wykazano również antymitotyczne i proapoptotyczne działanie BoNT/A na komórki nowotworowe raka prostaty oraz piersi – działania związane m.in. ze stymulacją aktywności kaspazy 3/7 (Karsenty i wsp. 2009; Bandala i wsp. 2013).

Toksyczność botuliny i bezpieczeństwo terapii

Spośród opisanych toksyn botulinowych tylko cztery typy powodują zatrucia u ludzi (typy A, B, E, F). Biorąc pod uwagę okoliczności zatrucia i źródło toksyny botulinowej, można wyróżnić następujące postacie choroby: botulizm pokarmowy (klasyczny, po spożyciu skażonej żywności), botulizm niemowląt, botulizm przyranny (po zanieczyszczeniu rany sporam), botulizm aerogeny i wreszcie – botulizm jatrogeny (po zastosowaniu botuliny w celach leczniczych lub kosmetycznych) (Martirosian 2014).

Zatrucie toksyną botulinową w najcięższych przypadkach może skutkować zgonem osoby zatrutej.

Śmiertelność w klasycznym botulizmie sięga 70%. Nie bez przyczyny toksyna botulinowa była i nadal jest traktowana jako możliwa do wykorzystania przez terrorystów niebezpieczna broń biologiczna (Pita i Romero 2014; Chudzicka 2015). Nawet bardzo małe dawki toksyny botulinowej (30 ng) mogą być śmiertelne dla człowieka, należy jednak zauważyć, że dawka letalna dla człowieka nie została ściśle określona.

Na szczęście, mimo dużej toksyczności samej botuliny, na podstawie dotychczasowego doświadczenia klinicznego można stwierdzić, że iniekcje z tą toksyną w zalecanych dawkach i wykonywane zgodnie z przyjętymi zasadami są metodą bezpieczną i mogą być z powodzeniem stosowane, zarówno w szpitalach, jak i w leczeniu ambulatoryjnym. Co ważne, nie ma bezwzględnych przeciwwskazań do stosowania tej terapii.

Objawy niepożądane po podaniu botuliny występują u około 10% leczonych tą metodą i zależą od dawki oraz miejsca podania preparatu. Przeważnie są to objawy miejscowe, znacznie rzadziej – uogólnione, które najczęściej nie wymagają specjalnych działań terapeutycznych i znikają po kilku dniach lub tygodniach od wstrzyknięcia, nie pozostawiając żadnych trwałych uszczerbków na zdrowiu (Domżał 2009).

Typowe dla zatrucia botuliną objawy to: zaburzenia widzenia (opadanie powiek, rozszerzone źrenice, podwójne widzenie), suchość w ustach, zaparcia, ból brzucha, apatia, zmieniony głos i trudności w połykaniu, wynikające z mechanizmu działania toksyny – paraliżu wiotkiego mięśni. Przekroczenie standardowej dawki leczniczej lub też błędne podanie toksyny botulinowej (bezpośrednio do naczynia krwionośnego) może spowodować przemijające porażenia ruchowe mięśni odległych od miejsca iniekcji. Może również dojść do sprowokowania wystąpienia objawów u osób z utajoną miastenią. Są to jednak sytuacje rzadko obserwowane w praktyce.

W literaturze medyczno-sądowej opisano dotychczas tylko jeden przypadek śmierci po wstrzyknięciu botuliny A w mieszaninie z lidokainą (Li i wsp. 2005). Śmierć 43-letniej kobiety była spowodowana nagłą reakcją alergiczną na botulinę i/lub lidokainę, dlatego też, zdaniem autorów, w pełni zasadne jest posiadanie w gabinecie zestawu przeciwwstrząsowego, możliwego do wykorzystania w sytuacji wystąpienia objawów anafilaksji.

Rozpoznanie zatrucia botuliną opiera się na stwierdzeniu typowych objawów klinicznych oraz na wynikach badań dodatkowych. Materiałem biologicznym możliwym do wykorzystania podczas badań laboratoryjnych w kierunku zatrucia botuliną jest surowica krwi, a także – w przypadku botulizmu pokarmowego – zawartość żołądka czy kał. W diagnostyce toksykologicznej i mikrobiologicznej zastosowanie znajdują testy immunologiczne (np. ELISA), testy PCR, hodowle bakterii w warunkach beztlenowych oraz próby biologiczne na myszach. Diagnostyka pośmiertna zatrucia

jest niezwykle trudna, a obraz sekcyjny zwykle niespecyficzny (Devers i Nine 2010).

Leczenie zatrucia jest uzależnione od obrazu klinicznego (Chalk i wsp. 2014). Możliwa do wykorzystania pozostaje trójwalentna surowica antytoksyczna (antytoksyna). Aktualnie trwają również badania nad specyficznymi odtrutkami – inhibitorami (Kiris i wsp. 2014; Patel i wsp. 2014).

Zastosowanie botuliny w medycynie

Toksyna botulinowa typu A może być skuteczna w migrenie odpornej na leczenie. Przykładowo, w badaniu Lin i wsp. (2014) w ciągu 3 miesięcy od podania toksyny botulinowej u 40% osób nasilenie bólu migrenowego zmniejszyło się o 30%. Botulinę wykorzystuje się ponadto w medycynie estetycznej do korekcji zmian w napięciu mięśni związanych ze starzeniem się (Braz i wsp. 2013), w leczeniu zespołu bolesnego pęcherza (Giannantoni i wsp. 2010), terapii przewlekłych mialgii (De Andrés i wsp. 2010), blefarospazmu (Borodic 2010), neuralgii (Taylor i wsp. 2008), zespołu niespokojnych nóg (Lim i Seet 2007) czy pochwyty (Ferreira i Souza 2012).

Botulina w leczeniu depresji

W 2006 roku Finzi i Wasserman opublikowali wyniki obserwacji serii 10 przypadków pacjentów z depresją, którym podawali toksynę botulinową A do bruzd mimicznych na gładziźnie czoła. Mimo iż badanie jest serią przypadków, badacze dołożyli wszelkich starań, żeby było ono poprawne metodologicznie. Aby wykluczyć wpływ innych czynników poza botuliną, u osób badanych nie dokonywano żadnych zmian zarówno w leczeniu farmakologicznym depresji, jak i w stosowanej psychoterapii. Siedem na 10 osób w badaniu było leczonych farmakologicznie co najmniej jednym z leków przeciwdepresyjnych. Wszyscy chorzy byli badani i diagnozowani według kryteriów DSM-IV przez psychiatrę i oceniani psychologicznie. U dziewięciu osób zdiagnozowano depresję jednobiegunową, a u jednej osoby – dwubiegunową. Do badania rekrutowano jedynie osoby z umiarkowaną lub ciężką depresją. W kryteriach włączenia do badania zakładano ponadto trwałość objawów depresyjnych – do analizy włączono tylko osoby, u których czas depresji przekraczał 6 miesięcy. Wszystkie osoby uczestniczące w badaniu przyjmowały botulinę pierwszy raz w życiu. Badacze podczas ponownego badania pacjentów skalą Becka po 2 miesiącach stwierdzili, że u dziewięciu z 10 pacjentów ustąpiły objawy depresyjne. Badanie to, opublikowane w czasopiśmie poświęconym chirurgii kosmetycznej, stało się pierwszym doniesieniem traktującym o możliwości leczenia depresji za pomocą toksyny botulinowej typu A (Finzi i Wasserman 2006).

Po tej serii publikacji opisującej przypadki pacjentów Wollmer i wsp. w 2012 roku przeprowadzili po raz pierwszy badanie kliniczne, w którym postanowili sprawdzić, czy istotnie podawanie botuliny typu A pacjentom z depresją może spowodować u nich poprawę stanu psychicznego. Badanie było poprawne metodologicznie. Przeprowadzono je w dwóch ośrodkach, na grupie 30 pacjentów, którzy nie byli leczeni lekami przeciwdepresyjnymi i u których nie stosowano psychoterapii. Depresję diagnozowano na podstawie kryteriów DSM-IV, do badania włączano jedynie osoby o umiarkowanym lub ciężkim nasileniu choroby. Randomizowano ich do grupy badanej i grupy placebo. Pacjenci w grupie badanej otrzymywali iniekcje botuliny A, a w grupie placebo zamiast toksyny podawana była sól fizjologiczna. Po 6 tygodniach od podania toksyny w grupie badanej nastąpiło zmniejszenie nasilenia objawów depresyjnych, mierzonych skalą depresji Hamiltona o 47,1% w porównaniu z nasileniem sprzed podania botuliny. W grupie placebo zmniejszenie nasilenia depresji było znacznie mniejsze i wyniosło 9,2%. Było to pierwsze badanie kliniczne, które wykazało, iż podawanie botuliny A może przynieść dalszą poprawę kliniczną u pacjentów leczonych z powodu depresji.

Hexsel i wsp. w 2013 roku przeprowadził kolejne badanie kliniczne, w którym 25 kobiet z umiarkowaną lub ciężką depresją, diagnozowaną na podstawie kryteriów DSM-IV, otrzymało jednorazową iniekcję z botuliny A w okolicę zmarszczek na gładziźnie czoła, a 25 zdrowym kobietom podano sól fizjologiczną. Badanie miało charakter otwarty i prospekcyjny i trwało 12 tygodni. Wszystkie kobiety przyjmowały co najmniej jeden lek przeciwdepresyjny. W grupie badanej uzyskano znaczne zmniejszenie nasilenia objawów depresyjnych w skali Becka, największe w ósmym tygodniu po iniekcji. Badanie to potwierdziło ponownie, iż toksyna botulinowa może być skuteczną metodą leczenia depresji.

W kolejnym randomizowanym badaniu klinicznym z podwójnie ślełą próbą badano aż 85 osób z dużą depresją, diagnozowaną według kryteriów DSM-IV (Finzi i Rosenthal 2014). W badaniu założono niewprowadzanie żadnych zmian w farmako- i psychoterapii na miesiąc przed włączeniem do badania. Wykluczono ponadto osoby odporne na farmakologiczne leczenie depresji. Uczestników badania randomizowano i w grupie badanej mężczyźni otrzymywali 40 jednostek botuliny w mięsień marszczący brwi i mięsień podłużny nosa. Ostatecznie przeanalizowano 74 osoby, a badanie trwało 6 tygodni. Ocena nasilenia depresji była dokonywana z użyciem skali Montgomery – Åsberg (MADRS) trzykrotnie – na początku badania, a następnie po 3 i 6 tygodniach. Okazało się, że objawy depresyjne po 6 tygodniach trwania badania zmniejszyły się w grupie badanej o 52% ($p < 0,001$), a o 15% w grupie placebo. Odsetek remisji, definiowany w skali MADRS na 10 lub mniej punktów, w grupie badanej wyniósł 27%, a w grupie placebo 7%. Różnica między obu grupami była statystycznie znamienna. Co ciekawe,

efekt działania przeciwdepresyjnego toksyny botulinowej wstrzykiwanej w mięsień w okolicy gładzizny czoła wydaje się przewlekły. Po kolejnych 6 tygodniach obserwacji poziom poprawy w zakresie objawów depresyjnych utrzymywał się na poziomie 47% w grupie badanej, w porównaniu z 21-procentową redukcją nasilenia objawów w grupie placebo. W podsumowaniu autorzy stwierdzili, iż podanie toksyny botulinowej typu A jest skutecznym i trwałym sposobem leczenia depresji endogennej.

W następnym badaniu klinicznym przeprowadzonym z podwójnie ślełą próbą 30 pacjentów z dużą depresją było randomizowanych do dwóch grup (Magid i wsp. 2014). Jedna otrzymywała toksynę botulinową A w postaci iniekcji w okolicę gładzizny czoła. Kobiety otrzymywały 29, a mężczyźni 39 jednostek toksyny botulinowej. Oceny stanu psychicznego dokonywane były co 3 tygodnie przez 6 miesięcy. W grupie osób, które otrzymywały toksynę botulinową, po 11 tygodniach nastąpiła statystycznie znamienna redukcja nasilenia objawów depresyjnych mierzonych 21-punktową skalą depresji Hamiltona – rzędu 55% i utrzymywała się ona do 24. tygodnia trwania badania, mimo iż kosmetyczny efekt działania toksyny botulinowej na czole zniknął między 12. a 16. tygodniem. Z kolei w grupie placebo nie nastąpiła żadna zmiana nasilenia objawów depresyjnych. Mierzono również częstość remisji depresji. U 18% osób nastąpiła pełna remisja objawów klinicznych (punktacja w HDRS < 7 pkt). Poziom remisji, jak można się spodziewać, był wyższy, kiedy pacjenci oceniali go subiektywnie w skali Becka (< 9 pkt) i kształtowała się na poziomie 30%. Na podstawie tych wyników ponownie wyciągnięto wnioski, iż botulina A może być skutecznym leczeniem dużej depresji o trwałym efekcie, alternatywnym wobec innych metod leczenia.

Próba wyjaśnienia mechanizmu działania iniekcji botuliny

Oczywiste jest, że to nie botulina A działa na depresję, tylko rozluźnienie mięśni mimicznych – marszczącego czoła oraz podłużnego nosa. W medycynie klasycznej nie istnieje żaden mechanizm tłumaczący ten efekt. Na pewno mechanizm ten zakłada istnienie dwukierunkowego sprzężenia zwrotnego między stanem depresji i martwienia się a jego ekspresją mimiczną w postaci pogłębienia się zmarszczek mimicznych w okolicy gładzizny. Co więcej, efekt przeciwdepresyjny przewlekłego rozluźnienia mięśni mimicznych związanych z ekspresją zmartwienia wskazuje na istnienie mechanizmu przeciwdepresyjnego o charakterze somatopsychicznym.

Być może, wyjaśnienie tego powiązania wymaga sięgnięcia do modeli związanych z tzw. polami morficznymi, które są odpowiedzialne zarówno za budowę, jak i funkcjonowanie naszego ciała. Być może, pole morficzne, z którym jest związane przeżywanie depresji, można zmienić przez zmianę ekspresji mimicznej. Możliwe są

jeszcze bardziej niekonwencjonalne wyjaśnienia. Mechanika kwantowa wyjaśnia, że tzw. ciało fizyczne składa się na poziomie elementarnym z formuł o naturze energetycznej. Ciało ludzkie jest więc upostaciowioną energią podlegającą wpływowi pól morficznych. Nieznany jest jeszcze kwantowy model pracy ciała ludzkiego, jednak jego zapowiedzi wydają się rewolucjonizować stan nauki. Przykładowo, praca Hameroffa i Penrose'a (2014) wskazuje, że każda komórka czy narząd mogą mieć świadomość. Zainteresowanym nowymi modelami biologii oraz funkcjonowania mózgu i organizmu człowieka odsyła się do tekstów źródłowych (np. Sheldrake 2011; Hameroff i Penrose 2014) lub prac poglądowych autorów, łatwo dostępnych w polskim piśmiennictwie naukowym (Krzyżanek 2015; Krzyżanek i wsp. 2015).

Jako ciekawostkę można przypomnieć, że w medycynie Dalekiego Wschodu miejsce głądzizny kojarzone jest z miejscami istotnymi dla krążenia energii psychicznej. Być może, w depresji oznaką fizyczną zablokowania tej energii jest utrwalony skurcz mięśni mimicznych w tej okolicy, a podanie botuliny A uruchamia jej przepływ. Oczywiście uwaga ta ma jedynie charakter spekulacji, bez nich jednak i ciągłego wątplenia niemożliwy jest rozwój nauki.

Należy wspomnieć również o możliwości psychologicznej interpretacji – efekt kosmetyczny, występujący po likwidacji tzw. lwiej bruzdy może spowodować lepszą samoocenę i poprawę samopoczucia. Interpretacji

tej może jednak zaprzeczać cytowane badanie Magid i wsp. (2014), w którym wykazano, że efekt kosmetyczny podania botuliny A utrzymuje się krócej niż działanie przeciwdepresyjne.

Autorzy nie dysponują niczym więcej poza opisanymi wyżej faktami naukowymi i spekulacjami. Być może, podobnie jak zaobserwowanie działania ketaminy pozwoliło na nowe rozumienie mechanizmów depresji, tak efekt iniekcji toksyny botulinowej otworzy nowy rozdział w teorii zaburzeń nastroju.

Podsumowanie

Od dziesięciu lat nauka wie, iż iniekcja toksyny botulinowej typu A w mięśnie marszczący czoło i podłużny nosa powoduje znaczące złagodzenie objawów depresyjnych rzędu 40–50%. Podanie toksyny jest bezpieczne i może być stosowane jako metoda wspomagająca leczenie depresji za pomocą leków przeciwdepresyjnych. Co ciekawe, jednorazowe podanie toksyny botulinowej osobie z depresją powoduje efekt przeciwdepresyjny utrzymujący się przez 4 miesiące, a nawet dłużej. Nie jest znany mechanizm działania tej metody. Dowody płynące z kilku poprawnych metodologicznie badań klinicznych zachęcają do szerokiego stosowania tej metody leczenia. ■

Introduction

Out of all methods for the treatment of depression known to modern psychiatry, two are extraordinary: those involving the use of botulinum toxin and ketamine. What distinguishes these from other methods is the durability of the single dose effect. In the case of ketamine, the antidepressive effect can persist for over a week, whereas the effect of botulinum toxin can last for months (Young 2013).

An original and interesting hypothesis has been put forward in recent years, according to which a single dose of botulinum toxin injected into the muscles linked with worrying and negative emotions may have an antidepressive effect. The place associated with the antidepressive effect of botulinum toxin is the area of the glabellar lines. Botulinum is injected into the corrugator supercilii muscle and the procerus muscle. Interestingly, the seemingly shaky hypothesis about the association between an emotional state and its mimetic expression has been investigated in many studies, hence multiple scientific evidence is now available indicating the antidepressive effect of botulinum toxin.

The authors' aim is to present an update on the knowledge we have of botulinum toxin, discuss its therapeutic

position in non-psychiatric areas of medicine and present the review of publications we consider most important with regards to the use of botulinum toxin in the therapy of depression.

Botulinum toxin (BTX)

Botulinum neurotoxin (BoNT), commonly known as botulinum toxin, is a protein synthesized by the gram-negative anaerobic bacteria *Clostridium botulinum*. It occurs in the form of seven serologically distinct types (BoNT/A-G), each of which comprises numerous isoforms (Popof and Bouvet 2013). Most of the research available in the medical literature regards the neurotoxin type A (BoNT/A), produced by the common species of *Clostridium botulinum*. The shared feature of all structural variants of the BoNT particle is the presence of two chains: L (light, 50 kDa) and H (heavy 100 kDa), connected by a specific disulfide (Swaminathan and Eswaramoorthy 2000; Montal 2010). The classic site of the impact of the toxin is the protein complexes of the presynaptic membrane and exocytic vesicles, implementing the process of the releasing of neurotransmitters, especially acetylcholine

at the neuromuscular junctions (Blasi *et al.* 1993). The mechanism of the impact of botulinum toxin on the synaptic connections is multistage, and closely linked to the activity of the specific molecular domains of its molecule. The first step is an attachment of the C-terminal fragment of the H chain to an as yet unidentified presynaptic membrane receptor. Its consequence is the internalization of the toxin molecule in the synaptic vesicles (Colasante *et al.* 2013). The next phase is the translocation of the catalytic subunit L in the vesicle membrane, with the participation of the N-terminal domain of the H chain. Finally, a reduction of the disulfide bonds takes place, followed by the release of the active metalloproteinase of the L chain to neuroplasm, and its highly selective attack on one of the three SNARE proteins: SNAP-25, synaptobrevin (VAMP) or syntaxin (Rossetto *et al.* 2015). The proteolysis of these neuronal proteins prevents the proper docking and fusion of the synaptic vesicles and, in practice, permanently blocks the operation of the synapsis. Also suggested is the existence of alternative intracellular mechanisms of the BoNT molecules' action, unrelated to the inhibition of the fusion of complex proteins. It has been observed that BoNT/A can inhibit the release of arachidonic and lysophosphatidic (LPA) acid, the membrane factors promoting the release of neurotransmitters (Ray *et al.* 1993; Ishida *et al.* 2004; Matak and Lacković 2015). Also postulated is the participation of BoNT/A in the regulation of the formation and elongation of the axonal endings (neurogenesis) of the motor nerves (Morbiato *et al.* 2007; Harrison *et al.* 2011). It is possible that BoNT/A can be a modulator of the expression of a number of functionally important genes of nerve cells. Human glutamatergic and GABA-ergic neurons, subjected to the *in vitro* 14-day activity of BoNT/A, revealed significant changes in the expression of numerous genes, particularly those associated with an increase of neurites and the sensitivity of calcium channels (Scherf *et al.* 2014; Matak and Lacković 2015). There are also reports that BoNT/A modifies the expression of the genes of selected neuropeptides, including enkephalin, galanin, P substance and neurotensin of the spinal cord neurons and peripheral autonomic ganglia *in vivo* (Humm *et al.* 2000; Bossowska *et al.* 2015). The antimitotic and proapoptotic effect of BoNT/A on prostate and breast cancer was also shown – as connected, among other things, with the stimulation of caspase 3/7 activity (Karsenty *et al.* 2009; Bandal *et al.* 2013).

Toxicity of botulinum and safety of the botulinum therapy

Only four of the botulinum toxins discussed cause toxicity in humans (types A, B, E, F). Taking into account the circumstances of poisoning and the source of botulinum toxin, we can distinguish the following forms

of the disease: foodborne botulism (classic, after eating contaminated food), infant botulism, wound botulism (after a wound comes to contact with the spores), aerogenic botulism and finally, iatrogenic botulism (after the application of botulinum toxin for medical or cosmetic reasons) (Martirosian 2014).

In the most severe cases, poisoning with the botulinum toxin can result in death. In classic botulism mortality reaches 70%, which is why the botulinum toxin is still regarded as potentially dangerous in the hands of terrorists, as a dangerous biological weapon (Pita and Romero 2014; Chudzicka 2015). Even very low doses of the botulinum toxin (30 ng) can be fatal to humans, although a lethal dose as such has not been yet specified.

Fortunately, in spite of the high toxicity of botulinum itself our clinical experience to date shows that its injection in recommended doses and in controlled environments are safe and can be successfully used in hospitals and in ambulatory care. Importantly, there are no definite contraindications against this form of therapy.

Adverse effects occur in approximately 10% of patients treated with this method and depend on the dose and the place of injection. Usually these are local symptoms, much less frequently generalized and they do not require any special therapeutic interventions, as they disappear after a few days or weeks after the injections, without leaving any permanent damage to the patient's health (Domżał 2009).

Typical botulinum poisoning symptoms include: blurred vision (ptosis, dilated pupils, double vision), dry mouth, constipation, abdominal pain, apathy, altered voice and difficulty swallowing, resulting from the impact of the toxin which causes flaccid muscle paralysis. Exceeding the standard therapeutic dose or a wrong application of the botulinum toxin (directly into a blood vessel) may cause transient paralysis of muscles remote from the place of injection. It can also provoke symptoms in people with latent myasthenia gravis. These are, however, situations rarely observed in practice. Only one case of death has been presented as yet in the medical/forensic literature following an injection of botulinum toxin A, mixed with lidocaine (Li *et al.* 2005). The death of a 43-year-old woman was caused by a sudden allergic reaction to botulinum toxin and/or lidocaine, which is why we recommend that an emergency set is available on-site in the doctor's surgery for the treatment of anaphylaxis.

Botulinum poisoning diagnosis is based on the recognition of typical clinical symptoms and results of laboratory tests. Blood serum is the biological material that may be used during laboratory testing for botulinum toxin poisoning, but also – in the case of foodborne botulism – stomach contents or faeces. Immunological assays are applicable (e.g. ELISA) in toxicological and microbiological diagnosis, as are PCR assays, cultures of bacteria in anaerobic conditions, and bioassay in mice. The post-mortem diagnosis of poisoning is extremely

difficult, and the autopsy image is usually non-specific (Devers and Nine 2010).

The treatment of poisoning depends on the clinical picture (Chalk *et al.* 2014). It is possible to use trivalent antitoxic serum (antitoxin). Various studies are also currently underway investigating specific antidotes (inhibitors) (Kiris *et al.* 2014; Patel *et al.* 2014).

The use of botulinum in medicine

Type A botulinum toxin can be effective in the treatment of drug-resistant migraine. For example in a study by Lin *et al.* (2014), in 40% of patients the intensity of migraine pain decreased by 30% within 3 months after botulinum was administered. Botulinum is also used in aesthetic medicine for the correction of age-related changes in muscle tension (Braz *et al.* 2013), but also otherwise for the treatment of painful bladder (Giannantoni *et al.* 2010), chronic myalgia (De Andrés *et al.* 2010), blepharospasm (Borodic 2010), neuralgia (Taylor *et al.* 2008), restless legs syndrome (Lim and Seet 2007) or vaginismus (Ferreira and Souza 2012).

Botulinum in the treatment of depression

In 2006, Finzi and Wasserman published the results of their observation of 10 patients with depression, treated with botulinum toxin A, injected into the glabellar lines. In spite of the fact that their study is a series of cases, the researchers put a lot of effort into their research being methodologically sound. In order to exclude the impact of factors other than botulinum, they allowed no changes to the pharmacological treatment of the people in their sample, or to their regime of psychotherapy. Seven out of ten people in their sample were treated pharmacologically with at least one antidepressant. All patients were diagnosed by a psychiatrist using the DSM-IV criteria and psychologically evaluated; nine were diagnosed with unipolar and one with bipolar depression. Patients recruited for the study suffered from moderate or major depression. The inclusion criteria assumed the persistence of depressive symptoms so only patients who had suffered from depression for a period of six months or more were considered. All participants in the study were administered botulinum for the first time in their life. The researchers tested their patients with the Beck scale two months later, and discovered that depressive symptoms subsided in 9 out of 10 patients. The results of the study were published in the aesthetic surgery journal, and was the first report discussing the possible treatment of depression with the botulinum toxin type A (Finzi and Wasserman 2006).

After the publication discussing case studies, in 2012 Wollmer *et al.* conducted the first clinical trial, in which

they aimed to see whether botulinum type A can really improve the mental condition of patients with depression. This methodologically sound study was carried out in two medical centres. It involved 30 patients who were treated with antidepressants but not with psychotherapy. Depression was diagnosed with the use of the DSM-IV criteria, and the study included only patients with moderate or severe depression. They were randomized into a group of patients who received botulinum injections and the placebo group. The verum group received injections of botulinum A, and the placebo group received physiological salt injections. Six weeks after the toxin was administered, the severity of depressive symptoms measured with the Hamilton Depression Scale was reduced by 47.1%. In the placebo group the reduction was much lower, at 9.2%. This was the first clinical trial to demonstrate that the administration of botulinum A can result in clinical improvement in patients treated for depression.

In 2013, Hessel *et al.* conducted another clinical trial, in which 25 women with moderate or severe depression, diagnosed with the DSM-IV criteria, received a single injection of botulinum A in the glabellar lines and 25 healthy women received an injection of physiological salt. The trial was open and prospective and lasted 12 weeks. All the women in the verum group took at least one antidepressant. A considerable reduction in the severity of depressive symptoms, measured with the Beck scale, was achieved in the sample, reaching its peak in the eighth week after the injection. Yet again, the trial confirmed that the botulinum toxin can be an effective means for controlling depression. Another double-blind randomized clinical trial involved 85 people with major depression, diagnosed according to the DSM-IV criteria (Finzi and Rosenthal 2014). No changes to the pharmacological treatment or psychotherapy of patients in the sample were allowed for 1 month prior to the trial. In addition, the trial excluded individuals with treatment-resistant depression. The participants were randomized and men in the sample received 40 units of botulinum toxin in the "lion's wrinkle" and the procerus muscle. 74 patients were eventually followed in the trial, which lasted six weeks. The assessment of the severity of depression was carried out three times with the use of the Montgomery-Åsberg Scale (MADRS): at the beginning of the trial, and then after three and six weeks. The trial concluded that after six weeks, the depressive symptoms were reduced in the sample by 52% ($p < 0,001$), and by 15% in the placebo group. The percentage of patients who went into remission, defined in the MADRS scale as 10 or fewer points, was 27% in the sample and 7% in the placebo group. The difference between the two groups was statistically significant. Interestingly, the antidepressive impact of the botulinum toxin, injected in the glabella area, seems long-term. After six weeks of observation, the level of improvement in depressive symptoms was

maintained at 47% in the sample, compared to 21% in the placebo group. The authors concluded that botulinum toxin type A is an effective and durable means for the treatment of endogenous depression.

The next study presented here involves a double blind sample of patients with major depression randomized into two groups (Magid *et al.* 2014). One received botulinum toxin A, injected in the glabellar area, with women being given 29 and men 39 units of botulinum toxin. The assessment of the patients' mental condition was carried out every three weeks over 6 months. After 11 weeks, a statistically significant reduction in the severity of depressive symptoms was observed in the group which received botulinum toxin. Measured with the 21-item Hamilton Depression Scale, the improvement reached 55% and was maintained until the 24th week of the duration of the trial, in spite of the fact that the cosmetic effect of botulinum toxin disappeared between the 12th and 16th week. In the placebo group, on the other hand, there was no visible improvement of symptoms. The frequency of remission of depression was also measured. In 18% of patients there was a full remission of depressive symptoms (< 7 points in HDRS). As could be expected, the level of remission was higher when patients assessed it subjectively using the Beck scale (< 9 points) – at 30%. Based on these results, the conclusion was again that botulinum A can be used effectively in the treatment of major depression with long-term effects, as an alternative form of treatment.

An attempt to explain the mechanism of the botulinum injection

It is obvious that it is not botulinum A that has an effect on depression but the relaxation of the mimic muscles: the frontalis muscle and the procerus muscle. Classic medicine offers no mechanism to explain this effect, although it certainly assumes the existence of two-way interaction between depression and worrying on the one hand and its mimic expression on the other, i.e. deepened wrinkles in the glabella region. What's more, the antidepressive effect of long-term relaxation of the mimic muscles, linked to worrying, indicates the existence of an antidepressive mechanism which is somatopsychic in nature.

Perhaps the explanation of this interconnection requires reaching for models related to so-called morphic fields, responsible for both the structure and functioning of the human body. Perhaps the morphic field linked to the experience of depression can be changed by altering the mimic expression. Even more unconventional

explanations still are possible. Quantum mechanics, for example, explains that the so-called physical body consists of the elementary level of formulas of energetic nature. The human body is therefore an embodied energy, subject to the impact of morphic fields. The quantum model of the human body is not known yet but its heralds seem to already revolutionise science. For example the work of Hameroff and Penrose (2014) indicates that every cell or organ can have consciousness. These new models of biology, the functioning of the brain and of the human body can be explored further through the source texts (e.g. Sheldrake 2011; Hameroff and Penrose 2014) or other reviews easily available, including in the Polish literature (Krzystanek 2015; Krzystanek *et al.* 2015).

Interestingly, in the medicine of the Far East the glabella is associated with the places crucial to the circulation of mental energy. Perhaps in depression one of the signs of energy being blocked is a fixed contraction of facial muscles in this area, meaning that botulinum A injections relax the muscles and enable the flow of energy. This is obviously, speculation but without speculation and constant doubt any progress in science is obviously impossible.

The psychological interpretation is also of relevance – the cosmetic effect of getting rid of the lion's wrinkle may result in better self-esteem and improved mood. This interpretation can, however, be rejected on the basis of the research by Magid *et al.* (2014), quoted above, which proved that the cosmetic effect wears off earlier than the antidepressive effect.

At this stage, what we have at our disposal are the scientific facts mentioned in this article and our speculations. Perhaps, similarly to the effect of ketamine, which has opened a new understanding of the mechanisms of depression, the effect of the botulinum toxin will open a new chapter in the theory of mood disorders.

Conclusions

It has been known for ten years that botulinum toxin A injections into the frontalis muscle and the procerus muscle results in a considerable reduction of depressive symptoms, by 40-50%. The use of this toxin is safe and it can be applied as a supporting method in the pharmacological treatment of depression. Interestingly, a single dose of botulinum toxin administered to a person with major depressive disorder results in an antidepressive effect which persists for 4 weeks or more. The mechanism behind this effect is unknown, yet evidence obtained from several methodologically sound clinical trials encourage the use of this method of treatment ■

Conflict of interest and financial support non declared. / Nie zgłoszono konfliktu interesów oraz dofinansowania.

The work described in this article has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, and Uniform Requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. / Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

Authors' contributions / Wkład autorów: MK – basic conceptual work, literature search, acceptance of the final manuscript version / zasadniczy wkład w koncepcję i projekt pracy, zbieranie piśmiennictwa, akceptacja ostatecznej wersji do opublikowania; RW – analysis of the literature in terms of the use of botulinum toxin in psychiatry / analiza piśmiennictwa i opracowanie go pod kątem zastosowania toksyny botulinowej w psychiatrii; RS – significant contribution to the conceptual work, literature search / znaczący wkład w projekt pracy, zbieranie piśmiennictwa; EM – significant contribution to the conceptual work, literature search / znaczący wkład w projekt pracy, zbieranie piśmiennictwa; AP – significant contribution to the conceptual work, literature search / znaczący wkład w projekt pracy, zbieranie piśmiennictwa

Piśmiennictwo / References

- Bandala C, Perez-Santos JL, Lara-Padilla E, Delgado Lopez G, Anaya-Ruiz M. Effect of botulinum toxin A on proliferation and apoptosis in the T47D breast cancer cell line. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14: 891–894.
- Blasi J, Chapman ER, Link E, Binz T, Yamasaki S, De Camilli P *et al.* Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature* 1993; 365: 160–163.
- Borodic GE. Orbicularis oculi myo-osseous fixation: a new treatment for benign essential blepharospasm and blepharospasm associated with diffuse facial dystonia (meige syndrome). *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2010; 41: 360–369.
- Bossowska A, Lepiarczyk E, Mazur U, Janikiewicz P, Markiewicz W. Botulinum Toxin Type A Induces Changes in the Chemical Coding of Substance P-Immunoreactive Dorsal Root Ganglia Sensory Neurons Supplying the Porcine Urinary Bladder. *Toxins (Basel)* 2015; 7: 4797–4816.
- Braz AV, Louvain D, Mukamal LV. Combined treatment with botulinum toxin and hyaluronic acid to correct unsightly lateral-chin depression. *An Bras Dermatol* 2013; 88: 138–140.
- Chalk CH, Benstead TJ, Keezer M. Medical treatment for botulism. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; 2: CD008123.
- Chudzicka A. Intoxication of botulinum toxin. *Pol Merkur Lekarski* 2015; 39: 153–156.
- Colasante C, Rossetto O, Morbiato L, Pirazzini M, Molgó J, Montecucco C. Botulinum neurotoxin type A is internalized and translocated from small synaptic vesicles at the neuromuscular junction. *Mol Neurobiol* 2013; 48: 120–127.
- De Andrés J, Aduara VM, Palmisani S, Villanueva V, López-Alarcón MD. A double-blind, controlled, randomized trial to evaluate the efficacy of botulinum toxin for the treatment of lumbar myofascial pain in humans. *Reg Anesth Pain Med* 2010; 35: 255–260.
- Devers KG, Nine JS. Autopsy findings in botulinum toxin poisoning. *J Forensic Sci* 2010; 55: 1649–1651.
- Domżał TM. Neurotoksyna botulinowa w praktyce lekarskiej (dystonie, spastyczność, ból i inne wskazania do leczenia). Wydawnictwo Czelej, Lublin 2009: 19–20.
- Ferreira JR, Souza RP. Botulinum toxin for vaginismus treatment. *Pharmacology* 2012; 89: 256–259.
- Finzi E, Rosenthal NE. Treatment of depression with onabotulinumtoxin A: a randomized, double-blind, placebo controlled trial. *J Psychiatr Res* 2014; 52: 1–6.
- Finzi E, Wasserman E. Treatment of depression with botulinum toxin A: a case series. *Dermatol Surg* 2006; 32: 645–649; discussion 649–650.
- Giannantoni A, Cagini R, Del Zingaro M, Proietti S, Quartesan R, Porena M *et al.* Botulinum A toxin intravesical injections for painful bladder syndrome: impact upon pain, psychological functioning and Quality of Life. *Curr Drug Deliv* 2010; 7: 442–446.
- Harrison AR, Berbos Z, Zaldivar RA, Anderson BC, Semmer M, Lee MS *et al.* Modulating neuromuscular junction density changes in botulinum toxin-treated orbicularis oculi muscle. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52: 982–986.
- Hameroff S, Penrose R. Consciousness in the universe: a review of the 'Orch OR' theory. *Phys Life Rev* 2014; 11: 39–78.
- Hexsel D, Brum C, Siega C, Schilling-Souza J, Dal'Forno T, Heckmann M *et al.* Evaluation of self-esteem and depression symptoms in depressed and nondepressed subjects treated with onabotulinumtoxinA for glabellar lines. *Dermatol Surg* 2013; 39: 1088–1096.
- Humm AM, Pabst C, Lauterburg T, Burgunder JM. Enkephalin and aFGF are differentially regulated in rat spinal motoneurons after chemodenervation with botulinum toxin. *Exp Neurol* 2000; 161: 361–372.
- Ishida H, Zhang X, Erickson K, Ray P. Botulinum toxin type A targets RhoB to inhibit lysophosphatidic acid-stimulated actin reorganization and acetylcholine release in nerve growth factor-treated PC12 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 310: 881–889.
- Karsenty G, Rocha J, Chevalier S, Scarlata E, Andrieu C, Zouanat FZ *et al.* Botulinum toxin type A inhibits the growth of LNCaP human prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Prostate* 2009; 69: 1143–1150.
- Kiris E, Burnett JC, Kane CD, Bavari S. Recent advances in botulinum neurotoxin inhibitor development. *Curr Top Med Chem* 2014; 14: 2044–2061.
- Krzystanek M. Metafizyka nowej psychiatrii. *Psychiatria* 2015; 12, 4: 265–270.
- Krzystanek M, Martyniak E, Pałasz A, Krupka-Matuszczyk I. Mechanika mitologenu społecznego. *Psychiatria* 2015; 12, 2: 62–66.
- Li M, Goldberger BA, Hopkins C. Fatal case of BOTOX-related anaphylaxis? *J Forensic Sci* 2005; 50: 169–172.
- Lim EC, Seet RC. Can botulinum toxin put the restless legs syndrome to rest? *Med Hypotheses* 2007; 69: 497–501.
- Lin KH, Chen SP, Fuh JL, Wang YF, Wang SJ. Efficacy, safety, and predictors of response to botulinum toxin type A in refractory chronic migraine: a retrospective study. *J Chin Med Assoc* 2014; 77: 10–15.
- Magid M, Reichenberg JS, Poth PE, Robertson HT, LaViolette AK, Kruger TH *et al.* Treatment of major depressive disorder using botulinum toxin A: a 24-week randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Psychiatry* 2014; 75: 837–844.
- Martirosian G. Rodzaj *Clostridium*. W: *Mikrobiologia lekarska*, red. P. Heczko, M. Wróblewska, A. Pietrzyk. PZWŁ, Warszawa 2014: 129–136.

30. Matak I, Lacković Z. Botulinum neurotoxin type A: Actions beyond SNAP-25? *Toxicology* 2015; 335: 79–84.
31. Montal M. Botulinum neurotoxin: a marvel of protein design. *Annu Rev Biochem* 2010; 79: 591–617.
32. Morbiato L, Carli L, Johnson EA, Montecucco C, Molgó J, Rossetto O. Neuromuscular paralysis and recovery in mice injected with botulinum neurotoxins A and C. *Eur J Neurosci* 2007; 25: 2697–2704.
33. Patel K, Cai S, Singh BR. Current strategies for designing antidotes against botulinum neurotoxins. *Expert Opin Drug Discov* 2014; 9: 319–333.
34. Pita R, Romero A. Toxins as Weapons: A Historical Review. *Forensic Sci Rev* 2014; 26: 85–96.
35. Popoff MR, Bouvet P. Genetic characteristics of toxigenic Clostridia and toxin gene evolution. *Toxicon* 2013; 75: 63–89.
36. Ray P, Berman JD, Middleton W, Brendle J. Botulinum toxin inhibits arachidonic acid release associated with acetylcholine release from PC12 cells. *J Biol Chem* 1993; 268: 11057–11064.
37. Rossetto O, Pirazzini M, Montecucco C. Current gaps in basic science knowledge of botulinum neurotoxin biological actions. *Toxicon* 2015; 107: 59–63.
38. Scherf JM, Hu XS, Tepp WH, Ichtchenko K, Johnson EA, Pellett S. Analysis of gene expression in induced pluripotent stem cell-derived human neurons exposed to botulinum neurotoxin A subtype 1 and a type A atoxic derivative. *PLoS One* 2014; 9: e111238.
39. Sheldrake R. Pola morfogenetyczne. W: Nowa biologia. Rezonans morficzny i ukryty porządek. Virgo, Warszawa 2011; 117–134.
40. Swaminathan S, Eswaramoorthy S. Structural analysis of the catalytic and binding sites of Clostridium botulinum neurotoxin B. *Nat Struct Biol* 2000; 7: 693–699.
41. Taylor M, Silva S, Cottrell C. Botulinum toxin type-A (BOTOX) in the treatment of occipital neuralgia: a pilot study. *Headache* 2008; 48: 1476–1481.
42. Wollmer MA, de Boer C, Kalak N, Beck J, Götz T, Schmidt T *et al.* Facing depression with botulinum toxin: a randomized controlled trial. *J Psychiatr Res* 2012; 46: 574–581.
43. Young SN. Single treatments that have lasting effects: some thoughts on the antidepressant effects of ketamine and botulinum toxin and the anxiolytic effect of psilocybin. *J Psychiatry Neurosci* 2013; 38: 78–83.