

Казахский национальный университет имени аль-Фараби

УДК 57:616.8 (043)

На правах рукописи

ЖАНТЛЕУОВА АЙША КАНАТОВНА

**Исследование воздействия непарализующих молекул ботулина на
нервную функцию**

8D05109 – Нейронаука

Диссертация на соискание ученой степени
доктора философии (PhD)

Научный консультант:
Каримова А.С., к.м.н.,
старший преподаватель

Зарубежный научный консультант:
Давлетов Б.А., д.б.н., профессор,
Университет Шеффилда
(Великобритания)

Республика Казахстан

Алматы, 2025

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ.....	4
ОПРЕДЕЛЕНИЯ.....	5
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	8
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1 Ботулинический нейротоксин.....	13
1.1.1 Структура ботулинического нейротоксина.....	13
1.1.2 Механизм действия ботулинического нейротоксина.....	13
1.2 Клиническое применение ботулинического нейротоксина типа А для контроля хронической боли.....	14
1.3 Антиноцицептическое действие ботулинического нейротоксина типа А	20
1.3.1 Ингибирование высвобождения ноцицептивных нейротрансмиттеров на периферии.....	20
1.3.2 Влияние на экспрессию ионных каналов - болевых рецепторов.....	21
1.3.3 Действие ботулинического нейротоксина типа А в центральной нервной системе.....	21
1.3.4 Другие предлагаемые механизмы.....	22
1.4 Последние разработки в области инжиниринга непарализующих молекул ботулина для терапевтического применения.....	23
1.4.1 Binary Toxin (BiTox).....	24
1.4.2 Binary Toxin-AA (BiTox/AA).....	26
1.4.3 Tetanus-Botulinum chimera (TetBot).....	26
1.4.4 Substance P-Botulinum neurotoxin (SP-Bot).....	27
1.4.5 Dermorphin-Botulinum neurotoxin (DermBot).....	27
1.4.6 Isopeptide-bonded botulinum neurotoxin (iBoNT).....	28
1.4.7 Elongated isopeptide-bonded botulinum neurotoxin (el-iBoNT).....	28
1.5 Хроническая мигрень.....	29
1.5.1 Патофизиология мигрени.....	30
1.5.2 Медикаментозная профилактика хронической мигрени.....	32
1.5.3 Животная модель хронической мигрени.....	34
1.6 Болевая диабетическая периферическая нейропатия.....	39
1.6.1 Патофизиология и лечение боли при болевой диабетической периферической нейропатии.....	39
1.6.2 Животная модель болевой диабетической периферической нейропатии.....	40
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	44
2.1 Этические аспекты проведения исследования.....	44
2.2 Ботулинические препараты.....	44
2.3 Объект исследования.....	49
2.4 Животные модели хронической боли.....	50
2.4.1 Нитроглицерин-индуцированная модель хронической мигрени...	50
2.4.2 Стрептозотоцин-индуцированная модель болевой диабетической	

периферической нейропатии.....	51
2.5 Поведенческие тесты	53
2.5.1 Электронный тест вон Фрея (механическая чувствительность).....	53
2.5.2 Тест Харгривза (температурная чувствительность).....	54
2.5.3 Шкала гримасы крысы.....	56
2.6 Инъекции ботулинических препаратов.....	57
2.7 Статистические методы.....	58
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	59
3.1 Структурная характеристика нового непарализующего ботулинического нейротоксина el-iBoNT.....	59
3.2 Определение паралитической активности нового непарализующего ботулинического нейротоксина el-iBoNT	60
3.3 Результаты лечения болевой гиперчувствительности в модели хронической мигрени.....	62
3.3.1 Шкала гримасы крысы.....	62
3.3.2 Электронный тест вон Фрея.....	74
3.3.3 Тест Харгривза.....	75
3.4 Результаты лечения болевой гиперчувствительности в модели болевой диабетической периферической нейропатии.....	76
3.4.1 Индукция гипергликемии.....	76
3.4.2 Поведенческие тесты в модели болевой диабетической периферической нейропатии.....	78
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	81
СПИСОК ПРИВЕДЕННЫХ РИСУНКОВ	82
СПИСОК ПРИВЕДЕННЫХ ТАБЛИЦ	84
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	85
ПРИЛОЖЕНИЕ А – Заключение локальной этической комиссии	100
ПРИЛОЖЕНИЕ Б – Шкала гримасы крысы	103

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:

1 ГОСТ 7.32–2001. Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления;

2 ГОСТ 7.1–2003. Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей диссертации применяют следующие термины с соответствующими определениями:

Ботулинический нейротоксин	– Нейротоксин, производимый бактериями рода <i>Clostridium</i> , блокирующий нейротрансмиссию путем расщепления белков комплекса SNARE в пресинаптических нейронах
Комплекс SNARE	– Набор белков, участвующих в слиянии везикул с пресинаптической мембраной, необходимых для выделения нейротрансмиттеров
Модель болевой диабетической периферической нейропатии, индуцированной стрептозотоцином	– Экспериментальная модель нейропатической боли вызываемая однократным введением стрептозотоцина для изучения терапии данного заболевания
Модель хронической мигрени, индуцированной нитроглицерином	– Экспериментальная модель хронической мигрени у крыс, вызываемая неоднократным введением нитроглицерина для изучения терапии данного заболевания
Порог боли	– Минимальная интенсивность стимула, воспринимаемого как боль. Измеряется в поведенческих тестах, таких как тест вон Фрея и тест Харгривза
Тест вон Фрея	– Поведенческий тест для измерения механической аллодинии (чувствительности к прикосновениям), применяемый в исследованиях боли
Тест Харгривза	– Метод оценки термической чувствительности у животных, при котором измеряется реакция на тепловое раздражение
Технология SpyCatcher–SpyTag	– Молекулярный инструмент, используемый для создания стабильных гибридных белков за счет образования изопептидной связи
Удлиненный изопептидно-связанный BoNT (el-iBoNT)	– Модифицированная версия ботулинического нейротоксина, сохраняющая анальгезирующие свойства без вызова паралича
Хроническая боль	– Боль, продолжающаяся более 3–6 месяцев после исчезновения первоначальной причины
Шкала гримасы крысы	– Метод оценки болевого состояния у крыс по выражению морды, часто используемый в моделях хронической боли

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

В настоящей докторской диссертации применяют следующие обозначения и сокращения с соответствующими расшифровками:

5-HT	- серотонин (5-гидрокситриптамиин)
ACh	- ацетилхолин
BiTox	- бинарный ботулинический нейротоксин
BiTox/AA	- бинарный ботулинический нейротоксин AA
BoNT	- ботулинический нейротоксин
BoNT/A	- ботулинический нейротоксин типа A
BoNT/B	- ботулинический нейротоксин типа B
BoNT/C	- ботулинический нейротоксин типа C
BoNT/D	- ботулинический нейротоксин типа D
BoNT/E	- ботулинический нейротоксин типа E
BoNT/F	- ботулинический нейротоксин типа F
BoNT/G	- ботулинический нейротоксин типа G
CFA	- полный адъювант Фрейнда
Derm-Bot	- ботулинический нейротоксин дерморфина
el-iBoNT	- удлиненный изопептидно-связанный ботулинический нейротоксин
FDA	- Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США
HC	- тяжелая цепь ботулинического нейротоксина типа A
iBoNT	- изопептидно-связанный ботулинический нейротоксин
LC	- легкая цепь ботулинического нейротоксина типа A
LD ₅₀	- летальная доза, вызывающей гибель 50% подопытных животных
NK1R	- рецептор нейрокинина 1
NTG	- нитроглицерин
P2X3	- лиганд-зависимый катионный канал из семейства P2X, член 3
PACAP	- гипофизарный аденилатциклаза-активирующий пептид
Rbd	- рецептор-связывающий домен ботулинического нейротоксина типа A
SNARE	- чувствительный к N-этилмалеимиду растворимый фактор присоединения белков
SNI	- модель повреждения седалищного нерва
SP	- субстанция P
SP-Bot	- ботулинический нейротоксин субстанции P
STZ	- стрептозотоцин
Td	- транслокационный домен ботулинического

	нейротоксина типа А
TetBot	– столбнячный ботулинический нейротоксин
TRPA1	– катионный канал переходного типа, член подсемейства А, член 1
TRPV1	– потенциальный катионный канал переходного типа, член подсемейства V, член 1
VIP	– вазоактивный кишечный пептид
АДФ	– аденозиндифосфат
АТФ	– аденозинтрифосфат
БДПН	– болевая диабетическая периферическая нейропатия
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ЛЭК	– локальная этическая комиссия
НАД	– никотинамид-адениндинуклеотид
ХБ	– хроническая боль
ШГК	– шкала гримасы крыс
ЭМГ	– электромиография
г (g)	– грамм
Ед (U)	– единицы
кг (kg)	– килограмм
кДа (kDa)	– килодальтон
л (L)	– литр
М	– моль
мг (mg)	– миллиграмм
мкл (μL)	– микролитр
мл (mL)	– миллилитр
мМ (mM)	– миллимоль
нг (ng)	– нанограмм
нМ (nM)	– наномоль
нм (nm)	– нанометр
об/мин (rpm)	– оборот в минуту
пМ (pM)	– пикомоль
см (sm)	– сантиметр

ВВЕДЕНИЕ

Общая характеристика работы. Диссертационное исследование направлено на изучение антиноцицептического потенциала нового непарализующего ботулинического нейротоксина (BoNT), удлиненного изопептидно-связанного BoNT (el-iBoNT), в животных моделях хронической боли.

Актуальность темы. Хроническую боль (ХБ) можно описать как боль, сохраняющуюся на протяжении длительного периода времени (более 3-6 месяцев) после стихания исходной причины (травмы или события) [1]. ХБ наносит значительный глобальный ущерб, затрагивая, по данным некоторых исследований, более 20% населения планеты [2]. В отличие от острой боли, которая служит целям выживания, ХБ правильнее рассматривать как заболевание [2, стр. 2083]. В мировом масштабе она приводит к таким негативным последствиям, как увеличение затрат на здравоохранение, понижение работоспособности населения, социальная дезадаптация. В первую очередь это связано с отсутствием специальных безопасных подходов, выработанных для использования при хронических болевых состояниях. Так, в настоящий момент фармакологическое лечение ХБ основано на комбинации противосудорожных и противовоспалительных средств, антидепрессантов и опиоидов для купирования болевого синдрома [3]. Недавно крупные организации, такие как Национальный институт здравоохранения и Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA), пришли к выводу, что такой подход лишь увеличивает расходы на здравоохранение, может привести к опиоидной зависимости, увеличению показателей инвалидности и смертности [4]. Высокая распространенность и рефрактерный характер ХБ в сочетании с негативными последствиями зависимости от обезболивающих препаратов привели к повышенному интересу к разработке новых подходов контроля боли.

Использование ботулинического нейротоксина представляет собой одно из таких направлений. Ботулинический нейротоксин является одним из самых сильнодействующих и смертоносных веществ, известных человечеству. Однако благодаря своему уникальному свойству долгосрочно блокировать нервную передачу BoNT стал эффективным средством для лечения/контроля множества заболеваний, среди которых можно отметить болевые синдромы. Использование BoNT в его нативной форме имеет большой недостаток – такой нейротоксин, блокируя нейротрансмиссию ацетилхолина (ACh) в нервно-мышечных синапсах, проявляет паралитическую активность. Это ограничивает максимально допустимую дозировку BoNT, введение которой безопасно для индукции анальгезии. В связи с этим разнообразные методы реинжиниринга

белков, нацеленные на манипуляции структурой нейротоксина, были направлены на устранение паралитической активности BoNT. Они используются для повышения эффективности BoNT в качестве анальгетика, а также для повышения его профиля безопасности. Так, с помощью технологии SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein)-stapling были сконструированы: Binary Toxin (BiTox), Binary Toxin/AA (BiTox/AA), Tetanus Toxin (TetBot), Substance P Toxin (SP-Bot), Dermorphine Toxin (Derm-Bot), с помощью технологии SpyCatcher–SpyTag – isopeptide-bonded BoNT (iBoNT) и elongated isopeptide-bonded BoNT (el-iBoNT) [5]. В представленной диссертационной работе был использован удлинённый изопептидно-связанный ботулинический нейротоксин el-iBoNT, который отличается от остальных модификаций прежде всего более стабильной связью между компонентами, что исключает диссоциацию частей нейротоксина, а также его удлинённой структурой, что уменьшает возможные побочные эффекты, связанные с паралитическим действием.

Данное исследование было финансировано Комитетом науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (ПЦФ № BR27198099).

Цель исследования. Оценить потенциал новых ботулинических молекул el-iBoNT в качестве непарализующих анальгетиков на животных моделях хронической боли.

Задачи исследования:

1. Продуцировать ранее разработанный новый ботулинический препарат el-iBoNT с использованием технологии SpyCatcher–SpyTag;
2. Сравнить паралитическую активность нативного и нового нейротоксина с помощью визуальной оценки;
3. Оценить способность el-iBoNT корректировать поведенческую гиперчувствительность в модели хронической мигрени;
4. Оценить способность el-iBoNT корректировать поведенческую гиперчувствительность в модели болевой диабетической хронической нейропатии.

Объекты исследования: половозрелые самцы белых лабораторных крыс, рожденные и выращенные в условиях учебно-научной лабораторной базы Казахского национального университета имени аль-Фараби (КазНУ им. аль-Фараби; г. Алматы, РК).

Предмет исследования. Эффективность нового непарализующего ботулинического препарата el-iBoNT в контроле болевых симптомов в животных моделях.

Методы исследования. В ходе работы были использованы молекулярно-генетические, биотехнологические, поведенческие, биохимические и статистические методы исследования. Молекулярно-генетические методы включали экспрессию рекомбинантных белков, их очистку, сборку el-iBoNT,

гель-электрофорез. Биотехнологические методы – культивирование трансформированных клеток *E. coli* в различных питательных средах. Поведенческое тестирование включало в себя шкалу гримасы крысы, тест Харгривза на определение температурной чувствительности и электронный тест вон Фрея на определение механической чувствительности. Концентрация глюкозы в крови крыс (биохимический показатель) оценивалась с помощью глюкометра. Статистический анализ был выполнен с использованием программы Prism 10.1.1, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA и IBM SPSS Statistics for Windows, Version 29.0.1.0 Armonk, NY, USA.

Исследовательская база. Все этапы исследования проводилось на базе лаборатории кафедры биофизики, биомедицины и нейронауки КазНУ им. аль-Фараби, за исключением этапа синтеза нового ботулинического препарата el-iBoNT. Данный этап был выполнен в лаборатории факультета биомедицинских наук университета Шеффилда (г. Шеффилд, Великобритания) во время научно-исследовательской стажировки.

Научная новизна диссертационной работы. Новый нейротоксин впервые был применен на модели нитроглицерин (NTG)-индуцированной хронической мигрени и стрептозотацин (STZ)-индуцированной болевой диабетической периферической нейропатии. Впервые была изучена паралитическая активность el-iBoNT при введении в больших дозах. В первый раз была оценена способность el-iBoNT корректировать механическую и температурную гиперчувствительность с помощью электронного теста вон Фрея и теста Харгривза соответственно. Впервые продемонстрирована эффективность el-iBoNT в профилактике хронической мигрени с помощью шкалы гримасы крыс (ШГК).

Теоретическая и практическая значимость работы. В настоящее время потенциал новых молекул ботулина в качестве непарализующих анальгетических агентов еще не изучен в животных моделях в полном объеме. Представленная работа направлена на исследование терапевтического потенциала el-iBoNT, представляющего собой удлиненный ботулинический нейротоксин типа А (BoNT/A) с изопептидной связью, на модели NTG-индуцированной хронической мигрени и STZ-индуцированной болевой диабетической периферической нейропатии. В работе также изучается паралитическая активность нового препарата, так как именно сильный паралитический эффект нативного нейротоксина является основной причиной его ограниченного использования в настоящий момент. Установлено, что сконструированный ботулинический препарат el-iBoNT обладает выраженной антиноцицептической активностью в отношении хронической боли и сниженной паралитической активностью. Таким образом, был внесен вклад в понимание молекулярно-клеточных механизмов действия модифицированного ботулинического нейротоксина. Проведенное исследование даст направление для дальнейшего изучения созданной молекулы в лечении других болевых синдромов, при которых нежелательно паралитическое действие токсина. В перспективе исследование позволит создать новую лекарственную молекулу для лечения хронических болевых синдромов у людей.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Получен элонгированный ботулинический нейротоксин типа А с изопептидной связью методом рекомбинантного синтеза с хроматографической очисткой;
2. Показана пониженная паралитическая эффективность el-iBoNT при внутримышечном введении в больших дозах;
3. Продемонстрирована эффективность терапии боли el-iBoNT в модели хронической мигрени;
4. Показана эффективность терапии боли посредством el-iBoNT в модели болевой диабетической периферической нейропатии.

Личный вклад автора. Автором был исследован процесс безопасного производства молекул ботулина для контроля ХБ с помощью современных биохимических подходов, методов молекулярной и клеточной биологии; было проведено исследование эффективности нового ботулинического нейротоксина el-iBoNT на моделях NTG-индуцированной хронической мигрени и STZ-индуцированной болевой диабетической периферической нейропатии с помощью таких поведенческих тестов, как ШКГ, электронный тест вон Фрея и тест Харгривза; была изучена паралитическая активность нового препарата; были написаны тезисы, научные статьи, диссертационная работа согласно установленному плану, согласованному с научными консультантами. Так, самостоятельно был поставлен эксперимент, собраны первичные данные, проведены статистический анализ и интерпретация результатов.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы доложены и опубликованы на следующих конференциях:

- Международная научная конференция студентов и молодых ученых «ФАРАБИ ЭЛЕМИ» (г. Алматы, РК, 4–7 апреля 2022);
- I Международная научно-практическая конференция «Интеграция наук: биофизика, биомедицина, нейронаука и биология» (г. Алматы, РК, 6 июня 2022);
- Международная научная конференция студентов и молодых ученых «ФАРАБИ ЭЛЕМИ» (г. Алматы, РК, 6–8 апреля 2023);
- II Международная научно-практическая конференция «Интеграция наук: биофизика, биомедицина, нейронаука и биология» (г. Алматы, РК, 25 мая 2023);
- Toxins 2024 7th International Conference (Berlin, Germany, 17-20 January 2024).

Основные результаты диссертации ежегодно заслушивались на заседаниях кафедры биофизики, биомедицины и нейронауки КазНУ им. аль-Фараби и на научных семинарах докторантов.

Публикации. Основное содержание диссертации отражено в 10 печатных работах, в том числе 2 статьях в изданиях, входящим в первый (Q1) квартиль базы данных Scopus [5, стр. 175; 6], 3 статьях в изданиях, входящих в перечень научных изданий, рекомендованных Комитетом по обеспечению качества в сфере образования и науки Министерства науки и высшего образования РК [7-9], 5 тезисах в материалах международных конференций, из которых 1 зарубежная [10-14].

Объём и структура диссертации. Диссертационная работа включает

введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты исследований и их обсуждение, заключение, список использованной литературы и приложения. Диссертация изложена на 103 страницах компьютерного текста, содержит 21 таблицу, 24 рисунка и 2 приложения (4 рисунка). Список использованных источников состоит из 183 наименований, из которых 91 опубликовано в последние 10 лет.

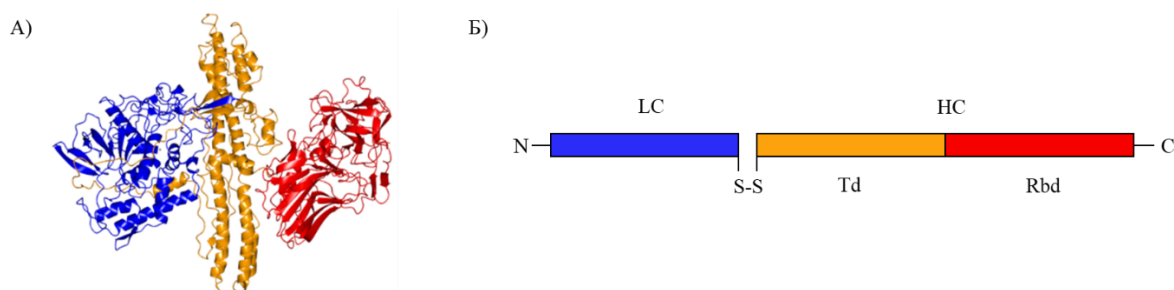
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Ботулинический нейротоксин

Ботулинические нейротоксины представляют собой семейство нейротоксинов, продуцируемых штаммами бактерий рода *Clostridium* [15]. В настоящее время BoNT классифицируют на 7 основных серотипов, начиная с BoNT/A и заканчивая BoNT/G. Несмотря на разнообразие, все BoNT являются протеазами, расщепляющими белки комплекса SNARE в пресинаптических терминалях нейронов [16]. Белки SNARE представляют основной механизм экзоцитоза, присутствуя как на везикулярной мембране (VAMP2/синаптобrevин), так и на клеточной мембране (SNAP25 и синтаксин). Образуя тетраэлическую спираль, они способствуют слиянию мембран и выделению нейротрансмиттера в синаптическую щель [17, 18].

1.1.1 Структура ботулинического нейротоксина

Каждый серотип ботулинического нейротоксина структурно представляет собой большой белок молекулярной массой ~150 кДа, состоящий из легкой цепи (LC) и тяжелой цепи (HC), соединенных дисульфидной связью в соответствии с рисунком 1.1. HC с молекулярной массой около 100 кДа включает в себя рецептор-связывающий домен (Rbd) и домен транслокации (Td), каждый из которых весит ~50 кДа. LC с молекулярной массой ~50 кДа проявляет цинк-эндопептидазную активность, необходимую для расщепления белков комплекса SNARE [19].



Примечания

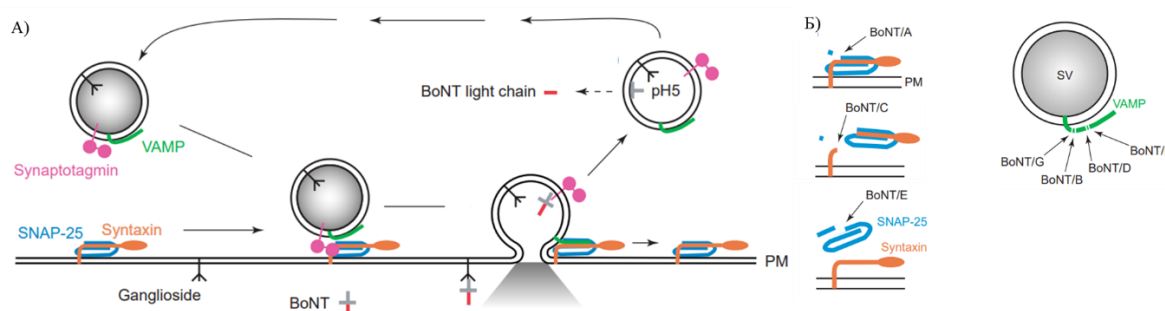
- 1 Легкая цепь (LC) окрашена в синий цвет, тяжелая цепь (HC) состоит из транслокационного домена (Td), окрашенного в оранжевый цвет, и рецептор-связывающего домена (Rbd), окрашенного в красный цвет;
- 2 Цепи объединены дисульфидным мостиком (S-S);
- 3 3Д структура BoNT/A основана на PDB 3BTA [20].

Рисунок 1.1 – Структура ботулинического нейротоксина типа А.
(А) Трехмерная структура BoNT/A; (Б) Схематичное изображение структуры BoNT/A

1.1.2 Механизм действия ботулинического нейротоксина

Как уже было сказано ранее BoNT, усекая специфические белки,

препятствует образованию комплекса SNARE и последующему экзоцитозу. При этом протеолитическая деградация является лишь заключительным этапом сложного механизма действия BoNT, которому предшествуют: а) связывание, б) интернализация и в) мембранная транслокация - в соответствии с рисунком 1.2А [19, стр. 593–594]. Рецептор-связывающий домен BoNT, расположенный в НС, опосредует нейрон-специфическое высокоаффинное связывание [21]. Для большинства серотипов при этом используется механизм двойного связывания, при котором Rbd избирательно связывается с как с белковым рецептором, так и с ганглиозидом, присутствующими на мембране нейрона [19, стр. 594–595]. После связывания BoNT интернализируется в клетки посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза, попадая в эндоцитарную везикулу. Кислая среда эндосомы вызывает рН-зависимое конформационное изменение в транслокационном домене BoNT, что позволяет Td встраиваться в эндосомальную мембрану, образуя канал, через который LC транслоцируется в цитозоль [22]. На этапе мембранной транслокации LC разворачивается из своей глобулярной структуры, чтобы пройти через узкий канал, образованный вставкой Td [23]. В цитозоле LC усекает специфические белки SNARE. Различные серотипы BoNT воздействуют на разные аминокислотные участки соответствующих SNARE белков в соответствии с рисунком 1.2. Например, BoNT/A и /E расщепляют SNAP25, BoNT/B, /D, /F и /G нацелены на VAMP, а BoNT/C уникальным образом расщепляет оба белка [24].



Примечания

- 1 PM – плазматическая мембрана;
- 2 SV – синаптическая везикула.

Рисунок 1.2 – Схематическое изображение механизма действия ботулинических нейротоксинов. (А) Модель проникновения BoNT в пресинаптическую терминаль; (Б) Дифференцированное действие BoNT на белки комплекса SNARE [25]

1.2 Клиническое применение ботулинического нейротоксина типа А для контроля хронической боли

Ботулинический нейротоксин, один из наиболее сильных токсинов известных человечеству, с летальной дозой 10^{-9} г/кг [26], способствует возникновению ботулизма, заболевания, проявляющегося мышечной слабостью и вегетативной дисфункцией. Несмотря на это ботулинический нейротоксин уже

на протяжении длительного времени используется в медицинских целях для лечения различных заболеваний. Переход от восприятия BoNT как опасного вещества к широкому применению в медицине произошел благодаря сильной доказательной базе, основанной на исследованиях, подтверждающих его эффективность в лечении состояний, связанных с нейромышечной или автономной нейрональной передачей. Идея клинического использования ботулинического нейротоксина впервые возникла в XIX веке на основе наблюдений за симптомами пищевого отравления у первооткрывателя ботулинического нейротоксина *Justinus Kerner*. Он считал, что контролируемые дозы «яда», вызывающего ботулизм могут лечить нервные расстройства [27]. После выделения различных серотипов BoNT и обнаружения *Burgen* и др. в 1970-х годах способность BoNT блокировать высвобождение ACh в нервно-мышечных соединениях [28] были предприняты первые попытки клинического применения токсина. Так, в 1973 году *Scott* и др. опубликовали результаты своего исследования, в котором показали, что низкие дозы BoNT, введенные в окулистические мышцы *Macaca mulatta*, были эффективны как при первичных, так и при повторных инъекциях [29] для лечения косоглазия. Дальнейшие клинические исследования подтвердили эффективность использования BoNT в лечении заболеваний, связанных с мышечным напряжением, таких как страбизм [30, 31], блефароспазм [32, 33], гемифациальный спазм [34, 35] и цервикальная дистония [36, 37]. В декабре 1989 г. BoNT/A был одобрен FDA для терапевтического лечения страбизма, блефароспазма и гемифациального спазма у пациентов старше 12 лет, в декабре 2000 г. BoNT/B – для лечения цервикальной дистонии [38]. После того как в 2002 году FDA одобрило применение BoNT/A для лечения глabellaрных морщин, он стал широко использоваться в косметической дерматологии для лечения гипердинамических морщин и восстановления баланса лицевых мышц [39]. В настоящее время BoNT является ведущей нехирургической косметической процедурой во всем мире [40].

В результате наблюдений за пациентами, лечимися инъекциями ботулинического нейротоксина, возникла гипотеза о его использовании не только в состояниях, требующих расслабления мышц, таких как описанных выше, но и при гиперсекреции наружных желез, в том числе потовых и слюнных. Так, в результате наблюдения за пациентами, получавших инъекции ботулинического нейротоксина для лечения гемифациального спазма, ученые обнаружили, что BoNT так же помогал пациентам, страдающим от краниофациального гипергидроза, справится с повышенным потоотделением [41]. В 2004 году нейротоксин получил одобрение FDA для лечения подмышечного гипергидроза [42]. В настоящее время BoNT является признанным методом лечения первичного подмышечного и очагового идиопатического гипергидроза. Ботулинический нейротоксин также высоко ценится в лечении сialореи у пациентов с болезнью Паркинсона, церебральным параличом, боковым амиотрофическим склерозом, болезнью двигательных нейронов и другими неврологическими заболеваниями. В августе 2019 года FDA одобрило применение BoNT/B для лечения хронической сialореи у взрослых [43].

Потенциальный обезболивающий эффект BoNT был первоначально отмечен при состояниях, характеризующихся чрезмерными мышечными сокращениями и повышенной нервно-мышечной активностью. При таких расстройствах, как цервикальная и аксиальная дистония, лечение BoNT/A эффективно снижает частоту и интенсивность непроизвольных мышечных сокращений, что приводит к одновременному уменьшению сопутствующей боли. В исследовании *Jankovic* и др. [34, стр. 633] 90% пациентов с цервикальной дистонией сообщили о значительном общем улучшении, включая уменьшение боли. В среднем пациенты оценивали свою боль как почти полностью устраненную, о чем свидетельствовала средняя реакция на боль 3,5 балла, где 0 означало отсутствие улучшения, а 4 – полное устранение боли. Аналогичным образом, в исследовании *Lundy* и др. [44] было обнаружено, что BoNT/A значительно уменьшает боль у всех пациентов с церебральным параличом, включенных в исследование. И если первоначально механизм облегчения боли объяснялся способностью BoNT/A вызывать паралич мышц, последующие исследования однозначно продемонстрировали, что обезболивающий эффект BoNT/A не ограничивается мышечной релаксацией. Так, обезболивание может сохраняться и после восстановления нормальной сократимости мышц. *Freund* и *Schwartz* [45] показали, что хотя расслабление мышц и обезболивание наступают одновременно после внутримышечного введения BoNT/A в жевательные и височные мышцы при височно-нижнечелюстном расстройстве, обезболивание продолжается и после того, как сила укуса, показатель сократимости мышц, возвращается к исходным значениям и даже превосходит их. И наоборот, *Relja* и *Klepac* [46] наблюдали значительное облегчение боли у пациентов с цервикальной дистонией после инъекции 50 Ед BoNT/A через неделю после лечения. Улучшение спастичности, однако, было выявлено только через две недели после лечения и, кроме того, для этого требовались более высокие дозы - 100 и 150 Ед BoNT/A. Кроме того, было описано облегчение боли при состояниях, практически не связанных с мышечной гиперактивностью, например, при хронической мигрени [47].

Эти открытия послужили толчком для широкого изучения эффективности ботулинического нейротоксина для контроля хронической боли. Однако, несмотря на данные систематических обзоров, подтверждающих эффективность BoNT при различных болевых состояниях (Таблица 1.1), и растущее признание, на настоящий момент FDA не одобрило применение инъекций BoNT для лечения каких-либо хронических болевых состояний, за исключением хронической мигрени.

Таблица 1.1 – Результаты использования BoNT/A при хронических болевых состояниях

Состояние	Результат	Источник
Хроническая мигрень	Через ~24 недели и ~52 недели количество дней головной боли в месяц уменьшилось (-10,64 [-2,31, -8,97]; -10,32 [-14,92, -5,73]); через ~24 недели количество дней приема лекарств от острой головной боли в месяц уменьшилось (-7,40 [-13,04, -1,77]); общий балл Headache Impact Test-6 составил (-11. 70 [-13,86, -9,54]); -11,80 [14,70, -8,90]); оценка качества жизни по шкале Migraine-Specific Quality-of-Life v2.1 изменилась (23,60 [21,56, 25,64]; 30,90 [28,29, 33,51]). Через ~24 недели общий балл по шкале Migraine Disability Assessment составил 44,74 [28,50, 60,99], а частота сокращений дней мигрени на $\geq 50\%$ составила 46,57% [29,50%, 63,65%]	[48]
Хроническая головная боль напряженного типа	Ботулотоксин А ассоциировался со значительным улучшением стандартизированной интенсивности головной боли (-0,502 [-0,945, -0,058]), частоты головной боли (-2,830 дней/месяц [-4,082, -1,578]), продолжительности ежедневной головной боли (-0,965 [-1,860, -0,069]) и частоты использования острых обезболивающих препаратов (-2,200 дней/месяц [-3,485, -0,915]) по сравнению с контролем. Улучшения, связанные с применением ботулотоксина А, превышали минимальные клинически значимые различия по интенсивности головной боли, частоте и использованию острых обезболивающих препаратов. На 79 % (28 %, 150 %) выше была частота ответов на лечение ботулотоксином А по сравнению с контрольной группой	[49]
Тригеминальная невралгия	Частота пароксизмов в день была значительно ниже в группе BoNT/A (-29.79 [-38.50,-21.08], $p < 0.00001$)	[50]
Болевая диабетическая нейропатия	Улучшение на 1,96 балла по визуально-аналоговой шкале (95% CI, -3.09 to -0.84; Z score = 3.43, $P < 0.001$) после лечения BoNT/A	[51]

Продолжение таблицы 1.1

Периферическая нейропатическая боль	Через 1 и 3 месяца после инъекции в группах BoNT/A наблюдалась меньшая средняя разница в оценке боли (-1,87 [-2,91; -0,83] и -1,38 [CI-1,95; -0,81]	[52]
Нейропатическая боль, связанная с травмой спинного мозга	Через 4 и 8 недель после введения препарата оценка боли по визуально-аналоговой шкале значительно снизилась: на $18,6 \pm 16,8$ и $21,3 \pm 26,8$ баллов в группе BoNT/A, в то время как в группе плацебо она снизилась на $2,6 \pm 14,6$ и $0,3 \pm 19,5$ баллов соответственно. Среди пациентов, ответивших на инъекцию BoNT/A, 55% и 45% сообщили об уменьшении боли на 20% и более через 4 и 8 недель после инъекции, в то время, как только 15% и 10% пациентов в группе плацебо сообщили об аналогичном уровне облегчения боли	[53]
Миофасциальные болевые расстройства	Результаты показали незначительное улучшение интенсивности боли после лечения в группе BoNT/A по сравнению с группой плацебо через 4–6 недель (-0.110 [-0.344 до 0.124]; P = 0.356) и значительное улучшение через 2-6 месяцев (-0.360 [-0.623 до -0.096]; P = 0.008). Количество участников исследования, ответивших на лечение, статистически значимо не отличалось между группами, как и повышение болевого порога при надавливании через 2 месяца (0.131 [-0.178 до 0.440]; P = 0.405)	[54]
Постинсультная боль в плече	Однократная внутримышечная инъекция ботулотоксина А значительно уменьшила боль через 3–6 месяцев после инъекции (-1.2 [-2.4 до -0.07]; шкала от 0 до 10), но не через один месяц (-1.1 [-2.9 to 0.7]). Внешняя ротация увеличилась через месяц (9.8 градусов [0.2 до 19.4]). Абдукция плеча, наружная ротация или спастичность не различались между группами, как и количество нежелательных явлений	[55]
Артритная боль в плече	Ботулотоксин уменьшил выраженность боли (-2.0, 95% CI -3.7 до -0.3; 10-бальная шкала), Shoulder Pain and Disability Index (-13.4, 95% CI -24.9 до -1.9; 100-бальная шкала) по сравнению с плацебо. Улучшилась абдукция плеча (13.8 градусов, 95% CI 3.2 до 44.0)	[55, стр. 3]

Продолжение таблицы 1.1

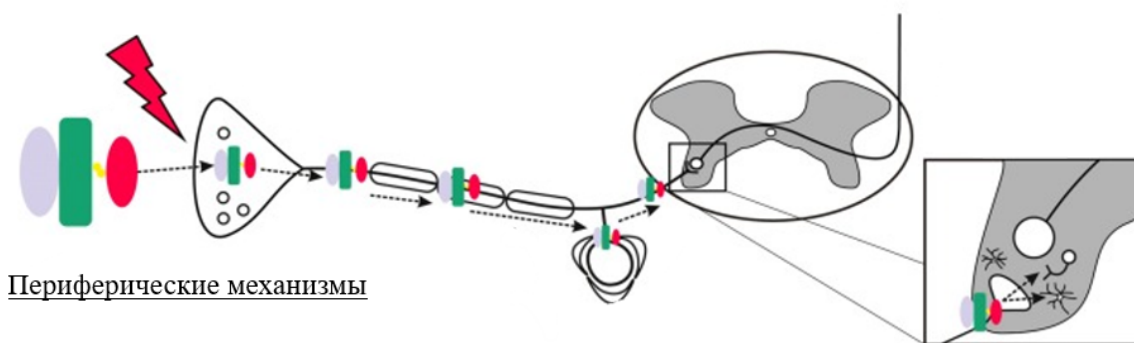
Латеральный эпикондилит	Умеренный эффект для боли (effect size -0.5, 95% CI -0.9, -0.1, I(2) = 56) через 3 месяца и отсутствие эффекта для силы хвата	[56]
Боль при фасциите	Общая эффективность BoNT/A в снижении боли при фасциите была значительной [MD=-2.59 (95% CI, -3.36, -1.82), P < .00001; I ² = 88%]. Анализ подгрупп показал, что BoNT/A был особенно эффективен при лечении плантарного фасциита [MD = -3.34 (95% CI, -4.08, -2.78), P < .00001; I ² = 75%], фасциита поясницы [MD = -2.17 (95% CI, -3.82, -0.52), P = .001; I ² = 93%], фасциита шеи и плеч [MD = -1.49 (95% CI, -2.76, -0.22), P = 0.02; I ² = 61%]	[57]
Синдром хронической тазовой боли	Было показано преимущество в облегчении боли у пациентов, получавших BoNT/A в общей когорте пациентов с синдром хронической тазовой боли мочевого пузыря, простаты и гинекологического происхождения	[58]
Боль после лечения рака	По сравнению с плацебо, инъекции BoNT/A у пациентов с болью после лечения рака приводили к клинически значимому уменьшению самоописанной боли после лечения [MD=-1.79 (95% CI: -2.14--1.43), P <0.00001, I ² =0%]	[59]

1.3 Антиноцицептическое действие ботулинического нейротоксина типа А

Как уже было отмечено ранее обезболивающий эффект BoNT не может быть полностью объяснен только расслаблением мышц. Вероятно, в основе данной способности BoNT лежат другие, еще не до конца определенные механизмы, основные из которых описаны ниже. В соответствии с рисунком 1.3 данные механизмы можно разделить на периферические и центральные.

Центральные механизмы

BoNT/A может предотвращать высвобождение центральных нейромедиаторов и активацию микроглии, а также модулировать активность спинальной опиоидной или ГАМК-эргической системы → сниженная центральная сенситизация



Периферические механизмы

BoNT/A ингибирует высвобождение нейромедиаторов из нервных окончаний и экспрессию болевых рецепторов на поверхности нейронов → сниженная периферическая сенситизация

Рисунок 1.3 – Действие BoNT/A на пути распространения боли [60]

1.3.1 Ингибирование высвобождения ноцицептивных нейротрансмиттеров на периферии

Одним из механизмов обезболивающего действия BoNT считается ингибирование высвобождения некоторых болевых нейротрансмиттеров. Опираясь на известный механизм действия на нервно-мышечные соединения, было предположено, что BoNT/A может предотвращать высвобождение сенсорных нейротрансмиттеров из периферических сенсорных нервных окончаний. Многочисленные исследования продемонстрировали способность BoNT/A блокировать высвобождение ноцицептивных нейротрансмиттеров *in vitro*. В первичных культурах сенсорных нейронов BoNT/A ингибирует высвобождение CGRP (кальцитонин-ген родственного пептида) [61] и субстанции P [62]. Это было подтверждено в препаратах мочевого пузыря *ex vivo* [63]. Исследования *in vivo* также показали снижение уровня глутамата и SP в тканях после периферического введения BoNT/A [64, 65]. На крысиной модели мигрени было показано, что BoNT/A снижает уровень CGRP *in vivo* [66]. Внутрикожное введение BoNT/A человеку уменьшило капсаицин- и термоиндуцированное высвобождение глутамата [67]. Исследование на человеческой модели также продемонстрировало снижение концентрации CGRP

через месяц после лечения BoNT/A [68].

1.3.2 Влияние на экспрессию ионных каналов - болевых рецепторов

Второй предполагаемый механизм обезболивающего действия ботулинических препаратов заключается в контроле экспрессии болевых рецепторов на поверхности нейронов. Вызывая расщепление SNAP-25, BoNT/A может препятствовать транслокации ноцицепторов из эндосомального компартмента в плазматическую мембрану клетки. Это было доказано для капсаицинового рецептора TRPV1, который является важным неселективным катионным каналом в передаче боли [69, 70]. BoNT/A также может нарушать функцию Na^+ каналов [71]. На основании изучения механической чувствительности дуральных афферентов было сделано предположение, что BoNT/A может снижать активность механочувствительных рецепторов TRPA1 [72, 73]. Исследования у пациентов с гиперактивным мочевым пузырем показывают, что он может снижать и нормализовать уровни рецепторов TRPV1 и P2X3 [74, 75]. Результаты исследования на мышах также подтверждают, что длительный анальгетический эффект ботулинических нейротоксинов связан с модуляцией рецепторов TRPV1 и TRPA1 [76]. В исследовании *Zhang* и др. [77] изучалось влияние экстракраниального введения BoNT на реакцию менингеальных ноцицепторов при стимуляции капсаицином и горчичным маслом, которые действуют как агонисты на рецепторы TRPV1 и TRPA1 соответственно. Результаты показали, что BoNT/A подавляет ответные реакции за счет снижения поверхностной экспрессии каналов.

1.3.3 Действие ботулинического нейротоксина типа А в центральной нервной системе

У BoNT может быть и третий механизм антиноцицептивного действия, связанный с его влиянием на центральную нервную систему. Это было показано в исследованиях на крысах, где нейротоксин воздействовал на боль на стороне тела, противоположной месту инъекции [78]. В модели «зеркальной боли», вызванной внутримышечным введением солевого раствора, BoNT/A, введенный в ипсилатеральную подушечку задней лапы, значительно снижает механическую гиперчувствительность как на поврежденной, так и на неповрежденной контралатеральной стороне [78, стр. 237]. Этот двусторонний эффект BoNT/A был последовательно продемонстрирован в различных других моделях двусторонней боли, включая воспалительную боль, вызванную введением полного адьюванта Фрейнда (CFA) в височно-нижнечелюстной сустав [79], полинейропатические состояния, вызванные системным паклитакселом [80] или стрептозотоцином [81].

Считается, что нейротоксин переносится от места инъекции к центральной нервной системе, но механизм этого действия требует уточнения. Двусторонний болеутоляющий эффект BoNT/A, по-видимому, зависит от аксонального транспорта, поскольку блокирование аксонального транспорта предотвращало уменьшение боли с обеих сторон. В одном из исследований [82] было показано, что аксональный транспорт BoNT происходит через сенсорные нейроны и

направляется к сенсорным ноцицептивным ядрам в центральной нервной системе. Для предотвращения аксонального транспорта использовалась инъекция колхицина, что в итоге предотвратило антиноцицептивный эффект препарата. Иммуногистохимическая маркировка, полученная в том же исследовании, продемонстрировала аксональный транспорт VoNT, что служит дополнительным доказательством как периферического, так и центрального механизма действия VoNT.

Интересно, что применение VoNT/A контралатерально повреждениям, вызванным кислым солевым раствором или каррагинаном, не вызывало двустороннего действия. В модели хронической механической гиперчувствительности, вызванной кислым солевым раствором, контралатеральный VoNT/A уменьшал боль только на стороне инъекции [78, стр. 238]. Аналогично, в модели механической гипералгезии, вызванной каррагинаном, контралатеральный VoNT/A не влиял на боль [83]. Эти данные свидетельствуют о том, что двусторонний эффект VoNT/A может зависеть от типа и механизмов повреждения, включая интенсивность и вещество, используемое для провоцирования повреждения тканей, а также от времени развития двусторонней боли.

1.3.4 Другие предлагаемые механизмы

Drinovac и др. [84, 85] предположили, что центральный антиноцицептивный эффект VoNT/A связан с усилением опиоидной и ГАМК-нейротрансмиссии, опосредованной соответствующими рецепторами (μ -опиоидными рецепторами и ГАМК-A). В экспериментах на крысах они обнаружили, что антагонист μ -опиоидных рецепторов налтрексон и антагонист ГАМК-A бикикуллин снижают эффект VoNT/A на боль при внутрибрюшинном или интратекальном применении. Более того, в модели нейропатической боли у мышей, вызванной хронической травмой сдавливания (CCI), совместное введение VoNT/A с морфином усиливало анальгетический ответ, и снижало толерантность к повторному применению морфина, что сопровождалось усилением экспрессии μ -опиоидных рецепторов на нейронах [86]. Это позволяет предположить, что модулирующие спинальные тормозные нейротрансмиттерные системы, которые, как известно, ослабляют сенсорный вход в дорсальный рог, играют важную роль в центральном антиноцицептивном действии VoNT/A. Однако точный механизм этого взаимодействия остается неясным. Возможно, он связан с неидентифицированными нейронными цепями в спинном мозге, а не с прямым действием VoNT/A на тормозные нейроны. Интересный ряд наблюдений на модели CCI, позволил предположить, что VoNT/A влияет на функциональное восстановление поврежденных периферических нервов. VoNT/A, введенный интраплантарно мышам с нейропатией увеличил экспрессию белка цикла деления клеток 2, пролиферацию и созревание шванновских клеток [87, 88]. Дальнейшие исследования показали, что VoNT/A может аксонально транспортироваться в седалищном нерве и проникать в шванновские клетки [89]. В исследовании *Mika* и др. [88, стр. 364] интраплантарное введение VoNT/A снижало механическую и термическую

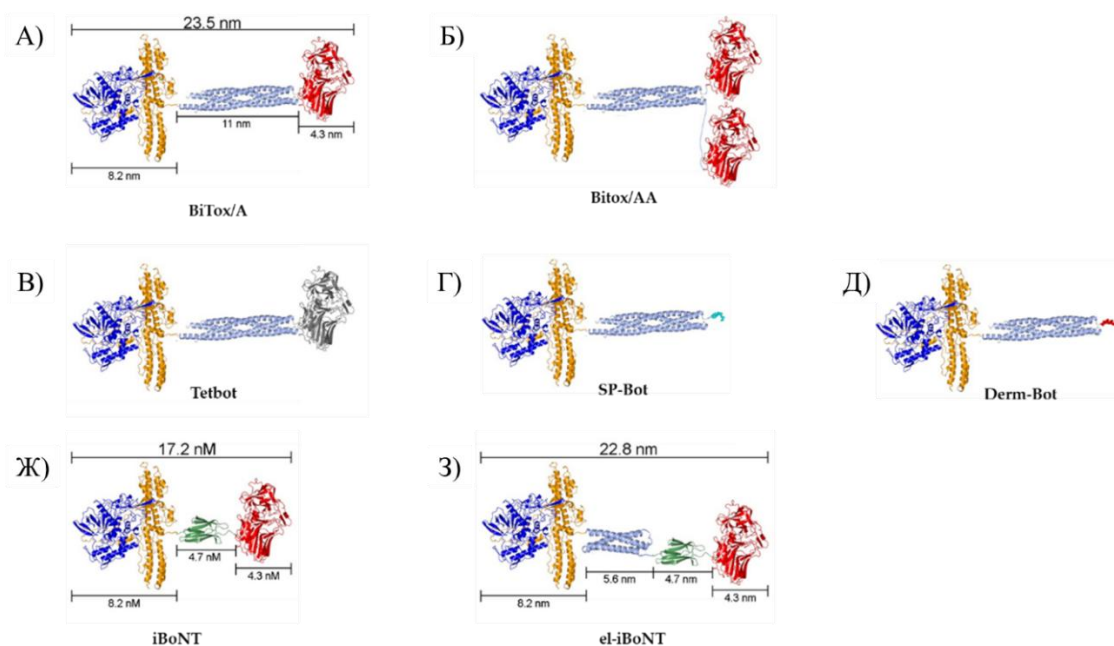
гиперчувствительность, вызванную CCI, и подавляло активацию микроглии. Было высказано предположение, что это ослабление активации микроглии и нейровоспаления способствует общему антиноцицептивному действию BoNT/A. Аналогичным образом, Zychowska и др. [90] продемонстрировали, что у крыс в модели CCI BoNT/A снижает активацию микроглии, уровень провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-18 и повышает концентрацию ингибирующих интерлейкинов IL-1RA и IL-10 в спинном мозге и/или дорсальном ганглии, что указывает на опосредованное BoNT/A восстановление нейроиммунного баланса, нарушенного в результате травмы нерва. Недавнее исследование *in vitro* [91] показало, что BoNT/A подавляет экспрессию провоспалительных цитокинов через ингибирование p38, ERK1/2 и NF- κ B-опосредованных внутриклеточных сигнальных путей. Эти результаты позволяют предположить вмешательство во внутриклеточные сигнальные процессы.

1.4 Последние разработки в области инжиниринга непарализующих молекул ботулина для терапевтического применения

Приведенные выше исследования демонстрируют, что нативный BoNT успешно используется в лечении ряда заболеваний, ассоциированных с хронической болью. При этом паралитическое действие нейротоксина не является основным механизмом обезболивания, но действует как ограничивающий фактор в использовании более высоких доз BoNT. Кроме того, BoNT имеет ряд побочных эффектов, связанных с миорелаксантным действием, такие как блефароптоз, мышечная слабость, лицевая асимметрия и т. д. [5, стр. 175].

Существующий интерес к использованию BoNT в болевой терапии привел к реинжинирингу нативной структуры BoNT с целью уменьшения его паралитической активности за счет изменения селективности или пространственных параметров.

Два новейших метода, SNARE-stapling и SpyCatcher-SpyTag, были применены для разработки непаралитических молекул ботулина для терапевтического применения. В результате чего были сконструированы семь BoNT с повышенным профилем безопасности в соответствии с рисунком 1.4.



Примечания

- 1 Программное обеспечение CCP4MG использовалось для создания 3D-моделей;
- 2 BoNT/A из PDB 3BTA [20, стр. 899], SNARE-комплекс из PDB 1SFC [92], удлиняющая последовательность синтаксина из PDB 1EZ3 [93], SpyCatcher-Spytag из PDB 4MLI [94], Substance P из PDB 7RMH [95].

Рисунок 1.4 – Сравнение конструкций ботулинического нейротоксина. (А) BiTox/A (спираль SNARE: светло-голубой); (Б) Bitox/AA; (В) Tetbot (рецептор-связывающий домен столбчатого токсина: серый); (Г) SP-Bot (субстанция Р: бирюзовый); (Д) Derm-Bot (пептид дерморфина: красный); (Ж) iBoNT (Spycatcher-Spytag: зеленый); (З) непаралитический удлиненный iBoNT (синтаксин-производная удлиняющая последовательность: светло-голубой) [5, стр. 6]

1.4.1 Binary Toxin (BiTox)

В новаторском исследовании, проведенном *Darios* и коллегами в 2010 г. [96], был разработан новый подход, названный в дальнейшем «SNARE-stapling», с использованием свойства белков комплекса SNARE для организации модульной сборки ботулинического нейротоксина. Этот комплекс, как было упомянуто ранее, включает SNAP25, VAMP2/синаптобревин и синтаксин, которые соединяясь образуют стабильную тетраэлическую спираль, имеющую решающее значение для слияния клеточных мембран в эукариотических клетках [18, стр. 275; 92, стр. 349]. Технология создания BiTox с помощью SNARE-stapling включает в себя создание двух модулей: VAMP2 с Rbd и SNAP25 с LC+Td и последующую сборку при добавлении «сшивающего» пептида – синтаксина в соответствии с рисунком 1.4А. В результате образуется вариант ботулинического нейротоксина BiTox (LCTd-SNARE-Rbd), демонстрирующий стабильность, проявляющий устойчивость к сильным детергентам, протеазам и повышенным температурам [97]. При введении в культуру нейронов гиппокампа

флуоресцентно меченый ViTox селективно локализовался в определенных синаптических контактах вдоль дендритных отростков, что указывает на целевое связывание с нативными рецепторами BoNT/A. Последующий иммуноблот-анализ с анти-SNAP25 антителами показал, что SNAP25 в нейронах подвергся протеолитическому расщеплению в соответствии с эффектами, наблюдаемыми после обработки BoNT/A. Эти опыты показали, что ViTox сохранял возможность присоединяться к своим рецепторам, интернализироваться в клетку, транслоцировать LC в цитозоль и расщеплять SNAP25 на пресинаптической поверхности. Последующие исследования *in vitro* подтвердили функциональность ViTox. В частности, инкубация изолированных синапсом мозга с ViTox ингибировала как кальций (Ca^{2+})-зависимое, так и вызванное калием (K^{+}) высвобождение глутамата. Нарушение высвобождения глутамата было эквивалентно тому, что наблюдалось после инкубации с BoNT/A, что подчеркивает эффективность ViTox в блокировании нейротрансмиссии и функции центральных нейронов. Для оценки его нервно-мышечного паралитического потенциала различные концентрации собранного нейротоксина вводили в изолированные препараты гемидиафрагмы мыши. ViTox продемонстрировал пониженную эффективность при блокировании нейротрансмиссии в нейро-мышечных синапсах. В частности, 75 минут инкубации с 190 пМ ViTox потребовалось для снижения амплитуды сократительного ответа в препаратах гемидиафрагмы мыши на 50%. Это различие, вероятно, связано с удлиненной структурой модифицированного токсина, которая может препятствовать его способности достигать и эффективно проникать в нервно-мышечные соединения. Дальнейший анализ был проведен на срезах мозга, в частности, на супрахиазматическом ядре (SCN), главном регуляторе циркадного ритма в мозге. Предыдущие исследования показали, что воздействие BoNT/A нарушает циркадные ритмы, регулируемые SCN. Когда ViTox в концентрации 6 нМ вводили в срезы SCN, наблюдалось быстрое и устойчивое подавление экспрессии циркадных белков, наблюдаемое в течение 24 часов и сохраняющееся более пяти дней. Таким образом, эффективность ViTox в подавлении циркадного ритма в SCN была сопоставима с той, что наблюдалась при использовании нативного токсина, как по степени, так и по продолжительности. Это говорит о высокой эффективности подавления межнейронной коммуникации по сравнению с нервно-мышечной передачей. Такие результаты подчеркивают потенциал ViTox для специфического воздействия на сенсорные пути, вовлеченные в передачу боли, и предлагают перспективный терапевтический путь для лечения заболеваний, требующих блокады специфических нейронных путей без вызывания широко распространенного нервно-мышечного паралича.

В последующем исследовании 2011 года Ferrari и коллеги [98] провели токсикологическую оценку нового варианта на животной модели. ViTox продемонстрировал значительно меньшую летальность по сравнению с нативным BoNT/A. Летальность при использовании нативного BoNT/A наблюдалась в течение 24 часов у мышей после внутрибрюшинного введения доз до 2 нг/кг. В отличие от этого, у мышей, которым внутрибрюшинно вводили до

200 нг/кг BiTox, не наблюдалось никаких признаков мышечного паралича или ухудшения самочувствия в течение 4 дней. Это свидетельствует о повышенном профиле безопасности.

В 2016 году *Mangione* и др. [99] провели оценку антиноцицептивного эффекта BiTox в различных преклинических моделях боли, включая воспалительную, хирургическую и нейропатическую модели. Аналогично нативному BoNT/A, интраплантарное введение 200 нг BiTox не оказало влияния на базовые пороги чувствительности у крыс, инъекция же BiTox через 24 часа после индукции модели боли привела к частичному и временному восстановлению базового порога механической чувствительности как в модели воспалительной боли, вызванной CFA, так и в модели послеоперационной боли. Более того, однократная инъекция BiTox эффективно предотвращала развитие и смягчала уже существующую гипералгезию после частичного повреждения седалищного нерва (SNI), модели периферической нейропатической боли.

1.4.2 Binary Toxin-AA (BiTox/AA)

В 2020 году *Andreou* и коллеги [100] применили методику «сшивания» для создания другой ботулинической молекулы под названием BiTox/AA, включающей два рецептор-связывающих домена в соответствии с рисунком 1.4Б. Для формирования BiTox/AA были получены три структурно независимые единицы: Rbd с пептидами синаптобревина или синтаксина, и Td+Lc с SNAP25. Смешивание этих единиц привело к формированию BiTox/AA, обладающего более высокой молекулярной массой по сравнению с нативным BoNT/A за счет наличия системы связывания и дополнительного связывающего домена. Сравнительный анализ расщепления SNAP25 BiTox/AA и нативным BoNT/A в культурах нейронов человека, выявил сходную эффективность. Оценка влияния BiTox/AA на паралич мышц с помощью электромиографии (ЭМГ), показала, что BiTox/AA обладает примерно в 100 раз меньшим парализующим потенциалом, чем BoNT/A. Авторы отметили ко-локализацию BiTox/AA с CGRP в нейронах тройничного нерва крысы. У крыс модели хронической мигрени предварительная обработка BiTox/AA (10 нг) значительно сокращала продолжительность ноцифензивного поведения после орофациального введения формалина.

1.4.3 Tetanus-Botulinum chimera (TetBot)

В 2013 году *Ferrari* и соавторы [101] применили методику SNARE-stapling для создания химерного токсина, TetBot. В этом токсине Td+LC домены BoNT/A были объединены с Rbd столбнячного токсина, близкородственного клостридиальному нейротоксину, в соответствии с рисунком 1.4В. В отличие от BoNT/A, который действует преимущественно периферически, столбнячный токсин транспортируется в центральную нервную систему, где его Rbd домен избирательно нацеливает его на тормозные нейроны спинного мозга. Это приводит к расщеплению VAMP2 в этих нейронах и последующему спастическому параличу [102]. Благодаря этой способности химера TetBot приобрела способность расщеплять SNAP25 в нейронах центральной нервной

системы. TetBot был введен в культуры нейронов гиппокампа для оценки его эффективности на центральных нейронах. Визуальные исследования показали интернализацию TetBot в синаптические терминалы гиппокампальных нейронов, что свидетельствует о его способности проникать в центральные участки нейронов. Подтвердилось, что TetBot успешно расщепляет SNAP25, сохраняя каталитическую активность, характерную для BoNT/A. Кроме того, TetBot продемонстрировал поразительное снижение эффективности блокирования мышечных подергиваний в 11 000 раз по сравнению с нативным BoNT/A при введении в изолированные мышцы гемидиафрагмы мыши. Интересно, что даже при внутримышечном введении 500 нг TetBot мышам не наблюдалось никаких признаков двигательного паралича и летального исхода, что свидетельствует о его высокой безопасности. LD₅₀ TetBot по меньшей мере в 10⁵ раз превышает LD₅₀ нативного BoNT/A. После подтверждения сохранения функциональности TetBot был испытан в модели воспалительной боли, вызванной CFA. Интратекальная инъекция 100 нг TetBot крысам показала, что TetBot ослабляет механическую гиперчувствительность, сохраняя этот анальгетический эффект в течение длительного времени.

1.4.4 Substance P-Botulinum neurotoxin (SP-Bot)

В исследовании *Maiarù* и др. в 2018 г. [103] была представлена молекула ботулина для борьбы с хронической болью названная SP-Bot. Молекула SP-Bot была разработана таким образом, чтобы нацеливаться на определенные подмножества спинальных нейронов, связанных с болью. SP-Bot состоит из Td+Lc BoNT/A, связанных с лигандом SP в соответствии с рисунком 1.4Г. Этот уникальный таргетный домен способствует интернализации и подавлению нейронов, экспрессирующих рецептор нейрокина 1 (NK1R) в спинном мозге, которые отвечают за передачу болевых сигналов. Однократная интратекальная инъекция SP-Bot не оказывала заметного влияния на исходный механический порог у наивных мышей или на их двигательную функцию. Однако в мышечных моделях воспалительной боли, индуцированной CFA, инъекция SP-Bot существенно снижала механическую гиперчувствительность (21 день для модели лодыжки, 12 дней для модели задней лапы). Так же эффективна инъекция была в модели SNI (22 дня). Специфичность SP-Bot в отношении нейронов, экспрессирующих NK1R, была подтверждена иммуногистохимическим окрашиванием. Кроме того, анальгетический эффект SP-Bot не проявлялся на мышцах с нокаутом NK1R. Дальнейшие исследования [104] продемонстрировали длительную эффективность SP-Bot. После однократной инъекции обезболивающий эффект сохранялся до 120 дней. По истечении этого срока обезболивающий эффект ослабевал. Примечательно, что вторая инъекция SP-Bot восстанавливала обезболивающий эффект, что говорит о возможности повторного введения препарата для поддержания эффективности.

1.4.5 Dermorphin-Botulinum neurotoxin (DermBot)

В уже упомянутом исследовании 2018 г. *Maiarù* и др. [103, стр. 4] представили еще одну новую молекулу под названием Derm-Bot. В соответствии

с рисунком 1.4Д Derm-Bot — это конъюгат на основе BoNT/A, связанный с пептидом дерморфина в качестве домена, связывающего опиоидные рецепторы. При интратекальном введении этой конструкции нейроны спинного мозга, экспрессирующие μ -опиоидные рецепторы, подавляются, тем самым обеспечивается эффект, аналогичный традиционным опиатам, хотя и в дозах, в 1000 раз меньших. Интратекальное введение Derm-Bot эффективно облегчало механическую гиперчувствительность в мышечных моделях воспалительной боли, вызванной инъекцией CFA в голеностопный сустав или заднюю лапу. Примечательно, что это облегчение боли сохранялось на протяжении всего эксперимента (18 дней). Более того, Derm-Bot значительно снижал механическую гиперчувствительность у мышей, подвергшихся SNI (23 дня). Иммуногистохимический анализ показал, что Derm-Bot эффективно воздействует на μ -опиоидными рецепторы-экспрессирующие нейроны в спинном дорсальном роге, не затрагивая первичные афференты. Кроме того, после введения Derm-Bot не наблюдалось признаков активации глиальных клеток или токсичности, что свидетельствует о его безопасности и специфичности.

1.4.6 Isopeptide-bonded botulinum neurotoxin (iBoNT)

В 2023 г. *Leese* и др. [105] представили новую молекулу ботулина под названием iBoNT, что расшифровывается как изопептидно-связанный BoNT. Используя технологию SpyCatcher-SpyTag, они соединили Lc и Td со SpyCatcher и Rbd со SpyTag в соответствии с рисунком 1.4Ж. Технология SpyCatcher-SpyTag [106] — это новый метод создания гибридных молекул, основанный на использовании бактериального модуля SpyCatcher и короткой пептидной метки SpyTag, которые соединяют любые белки путем образования изопептидной связи. iBoNT продемонстрировал способность эффективно расщеплять SNAP25 в нейронах дорсального ганглия крысы наравне с нативным BoNT/A. Паралитическая активность iBoNT, оцененная с помощью ЭМГ у крыс, а также значительный двигательный дефицит свидетельствовали о сохранении новой молекулой паралитической активности. Иммуногистохимический анализ подтвердил расщепление SNAP25 в мышечной ткани.

1.4.7 Elongated isopeptide-bonded botulinum neurotoxin (el-iBoNT)

Leese и др. [105, стр. 1] также разработали молекулу el-iBoNT сокращение от elongated isopeptide-bonded botulinum neurotoxin. В этой конструкции синтаксин 1A был вставлен между Td и SpyCatcher, создавая более удлиненную молекулу в соответствии с рисунком 1.4З. Вытянутая структура el-iBoNT была стабильной и демонстрировала эффективное расщепление SNAP25 в нейронах заднего корешкового ганглия крысы, как и iBoNT. Однако, в отличие от iBoNT, el-iBoNT продемонстрировал сниженную паралитическую активность при оценке ЭМГ у крыс. У животных, которым вводили el-iBoNT, не наблюдалось значительного двигательного дефицита, что указывает на его потенциал в качестве непарализующего блокатора. Кроме того, терапевтическая эффективность el-iBoNT была оценена на крысиной модели нейропатической

боли. Однократные инъекции el-iBoNT облегчили механическую гиперчувствительность у крыс без заметных побочных эффектов. Иммуногистохимический анализ выявил снижение активации микроглиальных клеток в спинном мозге, что свидетельствует об улучшении центральных процессов обработки боли, связанных с повреждением нервов. Эксперименты по иммуноокрашиванию продемонстрировали наличие расщепленного SNAP25 в нервных волокнах в дерме участков кожи лап крыс после инъекции el-iBoNT. Это позволяет предположить, что el-iBoNT воздействует на сенсорные нервные волокна в коже, в частности на миелиновые ноцицепторы, оканчивающиеся в дерме.

1.5 Хроническая мигрень

Хроническая мигрень – головная боль, возникающая в течение 15 или более дней в месяц на протяжении более трех месяцев, которая имеет признаки мигренозной головной боли по крайней мере в течение 8 дней в месяц [107, 108]:

А. Головная боль (мигреноподобная или подобная головной боли напряжения), возникающая более 15 дней в месяц в течение более 3 месяцев и отвечающая критериям Б и В.

Б. Возникает у пациента, у которого было как минимум пять приступов, отвечающих критериям Б–Г для Мигрени без ауры (Таблица 1.2 слева) и/или критериям Б и В для Мигрени с аурой (Таблица 1.2 справа).

В. Любое из следующих условий выполняется более 8 дней в месяц в течение более 3 месяцев:

1. критерии В и Г для Мигрени без ауры (Таблица 1.2 слева);
2. критерии Б и В для Мигрени с аурой (Таблица 1.2 справа);
3. в самом начале приступ расценен пациентом как мигренозный, и прием триптана или производного спорыньи принес облегчение.

Г. Не соответствует другому диагнозу МКГБ-3 3–5.

Таблица 1.2 – Критерии мигрени без ауры и мигрени с аурой

Мигрень без ауры	Мигрень с аурой
А. По меньшей мере пять приступов, отвечающих критериям Б–Г. Б. Продолжительность приступов 4–72 часа (без лечения или при неэффективном лечении). В. Головная боль имеет как минимум две из четырех следующих характеристик: 1. односторонняя локализация; 2. пульсирующий характер; 3. умеренная или высокая интенсивность боли; 4. головная боль ухудшается при	А. По меньшей мере два приступа, отвечающих критериям Б и В. Б. Один или более из следующих полностью обратимых симптомов ауры: 1. зрительные; 2. сенсорные; 3. речевые и/или связанные с языком; 4. двигательные; 5. стволовые; 6. ретинальные. В. По меньшей мере три из

обычной физической активности или заставляет избегать обычной физической активности (например, ходьба или подъём по лестнице). Г. Головная боль сопровождается как минимум одним из следующих симптомов: 1. тошнота и/или рвота; 2. фотофобия и фонофобия. Е. Не соответствует другому диагнозу МКГБ-3.	следующих шести характеристик: 1. как минимум один симптом ауры постепенно нарастает в течение >5 минут; 2. два или более симптома ауры возникают последовательно; 3. каждый из отдельно взятых симптомов ауры длится 5–60 минут¹; 4. как минимум один из симптомов ауры является односторонним²; 5. как минимум один из симптомов ауры является позитивным³; 6. в течение 60 минут после ауры или во время нее возникает ГБ. Г. Не соответствует другому диагнозу МКГБ-3.
---	---

Мигрень – сложное неврологическое заболевание, которым страдают миллионы людей во всем мире. Мигрень обычно переходит из эпизодического в хроническое состояние; такая трансформация происходит в целом у 2,5% пациентов ежегодно, причем особенно высокий риск связан с чрезмерным использованием препаратов для лечения острых заболеваний. В Соединенных Штатах около 3 миллионов человек страдают ХМ, и у значительной части пациентов мигрень приводит к хронической нетрудоспособности, которая обходится в более чем 15 миллиардов долларов в год. Несмотря на чрезвычайно высокую распространенность мигрени, терапевтические стратегии ограничены, и менее 50% пациентов с ХМ удовлетворены своим лечением. По-прежнему существуют миллионы людей, для которых имеющиеся в настоящее время методы лечения мигрени либо неэффективны, либо плохо переносятся [109].

1.5.1 Патофизиология мигрени

В XX веке преобладало мнение, что мигрень возникает из-за расширения кровеносных сосудов в головном мозге. На первый взгляд, эта теория казалась правдоподобной: пульсирующий характер мигренозных головных болей наводил на мысль о связи с сердцебиением, а эксперименты с введением пациентам с мигренью вазоактивных пептидов, таких как CGRP, могли вызывать мигренозные симптомы. Кроме того, стимуляция сосудов, окружающих твердую мозговую оболочку, также провоцировала мигренозные головные боли. Более того, такие препараты, как эрготамин, вызывающий сужение сосудов, приносили облегчение некоторым пациентам. Однако по мере развития исследований сосудистая теория мигрени утратила свою актуальность. Исследования показали, что ритм пульсации головной боли не совпадает с сердцебиением. Кроме того, некоторые вещества, такие как вазоактивный кишечный пептид

(VIP), могут вызывать расширение сосудов, не провоцируя мигрень. Таким образом, хотя кровеносные сосуды действительно играют определенную роль в приступах мигрени, сосудистая теория была в значительной степени дискредитирована. Вместо нее на первый план вышла более комплексная нейрососудистая теория, признающая сложное взаимодействие неврологических и сосудистых факторов в патофизиологии мигрени [110].

Хотя патофизиология мигрени на сегодняшний день изучена неполностью, достоверно известно следующее. Считается, что ветвь V1 тройничного нерва отвечает за передачу ноцицептивных импульсов во время приступа мигрени. Тройничный нерв – главный лицевой сенсорный нерв; самый крупный из черепных нервов, который возникает из нейронов, клеточные тела которых расположены в тройничном ганглии. Ветвь V1, глазничная ветвь, иннервирует этмоидальную и сфеноидальную пазухи, экстра- и интракраниальные сосуды (включая среднюю менингеальную артерию и мозговые синусы), твердую мозговую оболочку, а также кожу верхней части лица, включая нос, глаза и лоб [111]. Нейроны тройничного ганглия экспрессируют несколько пептидов, включая CGRP, гипоталамический аденилатциклаза-активирующий пептид (PACAP), SP, VIP [112]. Высвобождение вазоактивных нейропептидов, в частности CGRP и субстанции P, из тригеминальных нейронов первого порядка приводит к нейрогенному стерильному воспалению, вызывающему вазодилатацию, экстравазацию плазмы крови в результате утечки из капилляров, отек и дегрануляцию тучных клеток, что способствует дальнейшему развитию тригеминальной ноцицепции.

CGRP, как полагают, играет ключевую роль в патофизиологии мигрени. Повышенный уровень CGRP был обнаружен в плазме крови во время приступа мигрени, и он коррелировал с временем и тяжестью приступа [113]. Введенный пациентам с мигренью, CGRP расширяет экстра- и интрацеребральные артерии [114], вызывает начальную немигренозную головную боль, а также более позднюю (>1 часа) мигреноподобную головную боль у пациентов с мигренью [115]. Успешное лечение суматриптаном снижает концентрацию CGRP в плазме крови [116]. Хотя CGRP является мощным вазодилататором, его действие при мигрени не предполагается. Инфузия аналогичного вазоактивного нейропептида VIP расширяет краниальные артерии, вызывает легкую немигренозную немедленную головную боль, но не провоцирует приступы мигрени [117].

Тригеминальные сенсорные сигналы проходят по волокнам тройничного нерва в тройнично-цервикальный комплекс – область верхней части спинного мозга, включающую хвостатое ядро тройничного нерва и позвонки C1 и C2. Волокна от нейронов тройничного нерва первого порядка входят в центральную нервную систему на уровне продолговатого мозга, а затем проходят каудально до уровня C2, где синапсируют с нейронами второго порядка, либо непосредственно в поверхностных слоях, либо через интернейроны в более глубоких пластинках. В дорсальном роге спинного мозга находятся три типа нейронов второго порядка: ноцицептивные специфические нейроны в пластинках I и II получают ноцицептивный вход от волокон Aδ и C, низкопороговые нейроны в пластинках III и IV получают соматосенсорный вход

от волокон Аβ, а нейроны широкого динамического диапазона в пластинках V и VI получают как безобидные, так и ноцицептивные входы от волокон Аβ, Аδ и С. Таламус является важным ретрансляционным центром восходящего тригеминоталамического пути, собирая тригеминальные ноцицептивные сигналы и распространяя их дальше в высшие области коры головного мозга, в частности к коре S1, S2 и инсуле в соответствии с рисунком 1.5 [118, 119].

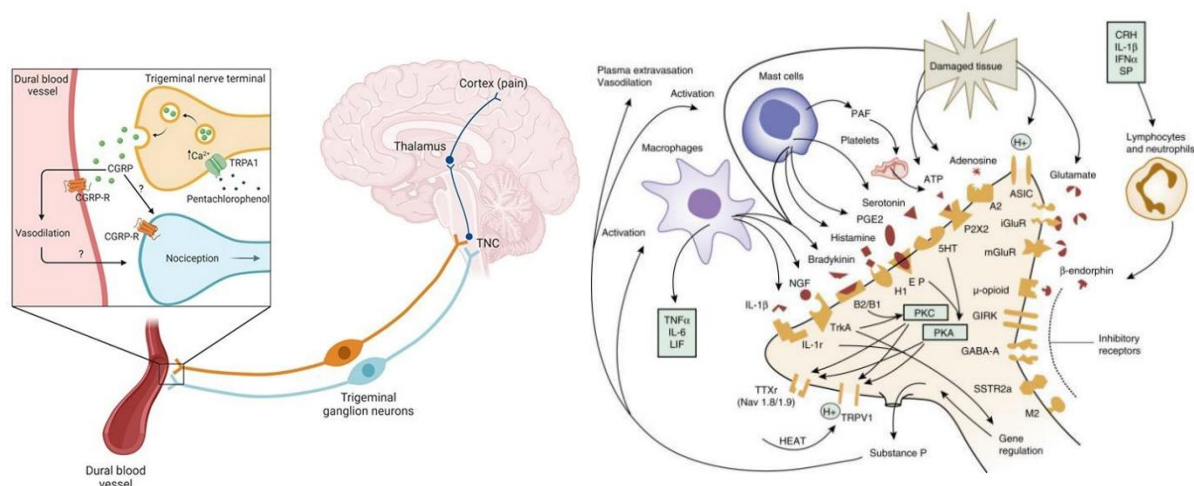


Рисунок 1.5 – Схематичное изображение основных структур/процессов в патофизиологии мигрени [120, 121]

Таким образом, хотя патофизиологии мигрени на сегодняшний день полностью не выяснена, большую роль играют нейротрансмиттеры боли, такие как CGRP и SP.

1.5.2 Медикаментозная профилактика хронической мигрени

Несмотря на успехи в профилактике мигрени, достигнутые за последние десятилетия, до сих пор существует множество проблем в успешном лечении мигрени у пациентов (Таблица 1.3). Побочные эффекты, связанные с профилактическими препаратами, а также частота их приема зачастую отталкивает пациентов от лечения. Уровень приверженности к профилактическим схемам лечения падает быстро, с 41–95% в 2 месяца до 35–56% в 12 месяцев, при этом побочные явления называются наиболее частой причиной прекращения лечения [122]. Кроме того, существует проблема рефрактерных пациентов, которые не отвечают на профилактическое лечение. В одном из исследований частота рефрактерных пациентов, посещающих отделения головной боли, составила 5,1% [123].

Таблица 1.3 – Обзор фармацевтических препаратов, доступных для профилактики хронической мигрени

Класс лекарственного средства	Лекарственное средство	Побочный эффект (наиболее распространенный)	Источник
<i>Первая линия</i>			
Бета-блокаторы	Атенолол	Усталость, головокружение	[124]
	Бисопролол	Усталость, головокружение	[125]
	Пропранолол	Брадикардия, артериальная гипотензия, бронхоспазм, желудочно-кишечные расстройства, головокружение, гипогликемия	[126]
Блокатор рецепторов ангиотензина II	Кандесартан	Головокружение, гипотензия, сонливость, астения	[127]
Противосудорожное средство	Топирамат	Парестезия, тошнота, анорексия, потеря веса, инфекция верхних дыхательных путей, утомляемость	[128]
<i>Вторая линия</i>			
Трициклический антидепрессант	Амитриптилин	Сухость слизистых оболочек, запор, головокружение, сонливость	[129]
Антагонист кальция	Флунаризин	Увеличение веса, седативный эффект, депрессия	[130]
<i>Третья линия</i>			
Моноклональные антитела к пептиду, родственному гену кальцитонина	Эренумаб	Усталость, боль в месте инъекции, запор, грипп, тошнота, боль в спине, инфекции верхних дыхательных путей, назофарингит	[131]
	Фреманезумаб	Боль в месте инъекции, уплотнение,	[132]

		эритема, диарея, тревога, депрессия	
	Галканезумаб	Боль в месте инъекции, эритема в месте инъекции, зуд в месте инъекции, реакция в месте инъекции, назофарингит, инфекции дыхательных путей	[133]
	Эптинезумаб	Инфекция верхних дыхательных путей, инфекция мочевыводящих путей, утомляемость, боль в спине, артралгия, тошнота и рвота	[134]
Ботулинический нейротоксин	ОнаботулотоксинА	Птоз, мышечная слабость	[135]

Таким образом, в данный момент не решена проблема по контролю мигренозной боли при хроническом состоянии, а существующие медикаментозные методы лечения характеризуются обширными побочными эффектами.

1.5.3 Животная модель хронической мигрени

В исследованиях ХМ используются различные животные модели, включая электрическую или химическую стимуляцию твердой мозговой оболочки, электрическую стимуляцию тройничного ганглия, системное введение NTG, а также использование различных генетических моделей. В представленной работе для изучения эффективности нового ботулинического препарата была использована NTG -индуцированная модель, которая подразумевает системное введение NTG каждый второй день в течение девяти дней [136].

Нитроглицерин – это лекарственный препарат, который обычно используется для лечения стенокардии. Расширяя кровеносные сосуды, он снижает нагрузку на сердце и улучшает кровоток. Связь между NTG и головной болью признана с момента его изобретения Sorbrero, который сообщил о сильной головной боли при приеме препарата. Нитроглицерин используют для индукции мигренеподобных эпизодов и в человеческой модели. Так, введение NTG вызывает легкую или умеренную бифронтальную пульсирующую головную боль в течение нескольких минут, причем как у людей с мигренью, так и у людей, не страдающих мигренью [137]. Эта головная боль связана с мощным

сосудорасширяющим действием NTG, которое, как полагают, опосредовано его превращением в оксид азота в эндотелии сосудистой стенки [138, 139]. Однако если у людей, не страдающих мигренью, NTG может вызывать легкую или умеренную головную боль, то у людей, страдающих мигренью [140, 141] или имеющих семейный анамнез мигрени [142], он спровоцирует приступ головной боли, напоминающий мигрень. Эта мигренеподобная головная боль может начаться в течение 45 мин после приема NTG или задержаться на 4–5 ч после того, как утихнет первоначальная умеренная головная боль. Важно отметить, что NTG также провоцирует появление общих предвестников и сопутствующих симптомов [141, стр. 677]. NTG обладает способностью вызывать активацию и сенсibilизацию в тригеминальной системе человека, что наблюдается и у больных мигренью. Более того, он стимулирует различные анатомические области, связанные с мигренью, включая шейный отдел спинного мозга, ядра тройничного нерва, ствол мозга и гипоталамус [143]. Приступ мигрени, вызванный NTG, также повышает уровень CGRP [113, стр. 465], который является важным фактором в патологии мигрени. Более того, было показано, что такие противомигренозные препараты, как суматриптан, уменьшают количество приступов мигрени, вызванных NTG [144], тем самым подтверждая эффективность модели. В животной модели эксперименты показали, что NTG может активировать и сенсibilизировать анатомические структуры, связанные с мигренью у животных. Системное введение NTG способно повысить уровень c-Fos у крыс [145], что указывает на активацию тригеминальной системы. Кроме того, было показано, что NTG влияет на уровни CGRP, 5-HT, TRPV1 [146, 147]. NTG вызывает стойкую гиперчувствительность задних лап и периорбитальной области, которая возвращается к исходному уровню примерно на 15-й день, то есть через 6-7 дней после последней инъекции NTG [148]. Эти реакции предотвращаются множеством препаратов для профилактики мигрени, включая топирамат, пропранолол и амилорид [149]. Введение NTG приводило к заметному сокращению дистанции амбуляции, наблюдаемому у крыс [150], что можно сравнить с потерей подвижности, наблюдаемой у больных мигренью. Кроме того, описано, что введение NTG может вызывать следующие коррелирующее с мигренью поведение: фотофобия и выражение боли через гримасу [151, 152]. Более подробно результаты поведенческих исследований описаны в таблице 1.4.

Таблица 1.4 – Обобщение результатов в ответ на системное введение NTG у грызунов

Доза	Тест	Результат	Терапия	Источник
5 доз в течение 9 дней, 10 мг/кг - мыши	Механическая чувствительность задней лапы (вон Фрей)	Развитие механической гипералгезии задней лапы было несколько более выражено у самок	Модель показала эффективность суматотропина и топирамата в подавлении вызванной гипералгезии	[136, стр. 273]
5 доз в течение 9 дней, 10 мг/кг - мыши	Механическая чувствительность задней лапы (вон Фрей) Чувствительность к теплу (погружение хвоста в водяную баню с температурой 46°C)	Механическая и тепловая гипералгезию, условное отвращение к месту	Три различных агониста δ -опиоидных рецепторов, SNC80, ARM390, JNJ20788560, уменьшали гипералгезию. SNC80 также отменял вызванное NTG условное отвращение к месту	[153]
5 доз в течение 9 дней, 10 мг/кг - мыши	Механическая чувствительность задней лапы (вон Фрей)	Развитие механической гипералгезии задней лапы	Модель показала эффективность PROP (бета-блокатора) и AMIL (ингибитора подавляли вызванную гипералгезию	[149, стр. 1054]
5 доз в течение 14 дней, 10 мг/кг - крысы	Шкала гримасы крысы Световая фоточувствительность (темно-светлый ящик) Механическая спонтанная аллодиния, подвижность	Механическая и тепловая гипералгезия	-	[152, стр. 68]

Продолжение таблицы 1.4

5 доз в течение 9 дней, 10 мг/кг - мыши	Тепловая и механическая (вон Фрей) чувствительность задних лап Периорбитальная механическая (вон Фрей) и холодовая чувствительность (ацетон)	NTG вызывал механическую и тепловую гиперчувствительность задних лап. Холодовая аллодиния, но не механическая гиперчувствительность, возникала в периорбитальной области	Отменяется блокатором TRP1 (ресинифератоксином)	[154]
4 дозы в течение 7 дней, 10 мг/кг - крысы	Механическая и тепловая чувствительность задней лапы (вон Фрей, тест горячей пластины) Ноцицептивное поведение Светобоязнь (светлый темный ящик и приподнятый крестообразный лабиринт)	Развитие механической и тепловой чувствительности, учащение ноцицептивного поведения, развитие фотофобии	Церебролизин (смесь нейротрофических факторов) заметно снижал механическую и тепловую гипералгезию, груминг головы и светобоязливое поведение	[151, стр. 200]
5 доз в течение 9 дней, 10 мг/кг - мыши	Механическая периорбитальная чувствительность и чувствительность задних лап (вон Фрей)	Развитие механической гипералгезии задних лап и периорбитальной гипералгезии	Отменен агонист δ -опиоидов, SNC80, введенный на 10-й день	[155]
5 доз в течение 9 дней, 5 мг/кг - крысы	Тепловая чувствительность (тесты горячая пластина и отдергивания хвоста) Тревожно-подобное поведение (открытое поле и	Развитие тепловой чувствительности в обоих тестах, учащение ноцицептивного поведения, учащение тревожно-подобного	-	[156]

Продолжение таблицы 1.4

	приподнятый крестообразный лабиринт) Фотофобия (светлый темный ящик) Спонтанное мигреноподобное ноцицептивное поведение	поведения, развитие фотофобии		
5 доз в течение 9 дней, 10 мг/кг - мыши	Механический и тепловой пороги (вон Фрей и тест на горячей плите)	Развитие механической и тепловой чувствительности	РАСАР6-38 облегчал ноцицептивную сенсibilизацию	[157]

Таким образом, модель системного повторяющегося введения NTG широко применяется в исследованиях по лечению мигрени. Она успешно имитирует клинически значимые конечные точек светобоязни, гипoaктивности, гримасы лица, а также механической и температурной гиперчувствительности.

1.6 Болевая диабетическая периферическая нейропатия

Сахарный диабет – одно из самых распространенных и серьезных хронических заболеваний мира. По оценкам, в настоящее время диабетом страдают 537 миллионов взрослых в возрасте 20–79 лет, что составляет 10,5% мирового населения этой возрастной группы. По прогнозам, к 2030 году их число возрастет до 643 миллионов (11,3%), а к 2045 году - до 783 миллионов (12,2%). Кроме того, 240 миллионов человек в мире живут с недиагностированным диабетом, то есть почти каждый второй взрослый, страдающий диабетом, не знает о наличии у него этого заболевания [158].

Диабетическая нейропатия – одно из самых распространенных осложнений диабета. На международном совещании по диагностике и лечению диабета было принято консенсусное заявление, в котором диабетическая периферическая нейропатия определяется как «наличие симптомов и/или признаков дисфункции периферических нервов у людей с диабетом после исключения других причин» [159].

Пациенты с болевой диабетической периферической нейропатией (БДПН) характеризуются покалыванием, онемением, жжением, мучительной колющей болью, которая иногда не проходит и может сопровождаться парестезией и гиперестезией в сочетании с глубокой болью в стопах или кистях. Как правило, заболевание проявляется в ночное время и в целом влияет на качество жизни человека, включая мобильность, работу, сон, настроение, самооценку, отдых и социальную активность [160]. Примерно у 50 % пациентов периферическая нейропатия развивается через 25 лет после первоначальной диагностики сахарного диабета. Распространенность БДПН составляет от 10 до 20% пациентов с диабетом, а у пациентов с диабетической нейропатией - от 40 до 50% [161].

1.6.1 Патофизиология и лечение боли при болевой диабетической периферической нейропатии

Хотя БДПН и является осложнением сахарного диабета, это отдельное заболевание, патофизиология которого плохо изучена. В связи с отсутствием лечения БДПН основное внимание уделяется лечению симптомов. Для людей с БДПН должен быть разработан мультимодальный план лечения. В таблице 1.5 представлены препараты, рекомендованные для лечения пациентов с БДПН. Однако из-за отсутствия длительного обезболивающего действия и побочных эффектов эти препараты часто неэффективны или плохо переносятся [162]

Таблица 1.5 – Препараты для лечения пациентов с БДПН [163]

Класс	Препарат	Побочный эффект
Противосудорожные препараты	Карбамазепин	Атаксия, запор, головокружение, сонливость, тошнота, рвота
	Габапентин	Атаксия, головокружение, сонливость, усталость, периферические отеки

Продолжение таблицы 1.5

	Окскарбазепин	Боль в животе, атаксия, головокружение, сонливость, головная боль, гипонатриемия, тошнота, нарушение зрения, рвота
	Прегабалин	Нечеткость зрения, головокружение, сонливость, сухость во рту, усталость, головная боль, периферические отеки, увеличение веса
Антидепрессанты	Амитриптилин	Спутанность сознания, запор, головокружение, сухость во рту, усталость, головная боль, бессонница, задержка мочи, увеличение веса
	Бупропион	Затуманенное зрение, запор, головокружение, сухость во рту, головная боль, бессонница, тошнота, рвота, потеря веса
	Дулоксетин	Снижение аппетита, сонливость, сухость во рту, усталость, головная боль, тошнота, рвота
	Нортриптилин	Спутанность сознания, запор, головокружение, сухость во рту, усталость, головная боль, бессонница, задержка мочи, увеличение веса
	Венлафаксин	Анорексия, астения, диафорез, головокружение, сонливость, сухость во рту, бессонница, тошнота
Местные средства	Капсаицин	Боль в месте нанесения, жжение, эритема, боль в конечностях
	Лидокаин	Жжение в месте нанесения, эритема, раздражение

Таким образом, стратегии лечения БДПН направлены на улучшение таких симптомов, как боль у отдельных лиц, однако их эффективность ограничена и сопряжена с широким списком побочных эффектов.

1.6.2 Животная модель болевой диабетической периферической нейропатии

Гипергликемия, характеризующаяся повышенным уровнем глюкозы в

крови, является отличительной чертой диабета. Ее хроническое присутствие в значительной степени способствует возникновению и прогрессированию диабетических осложнений. Диабетические осложнения включают в себя целый ряд заболеваний, таких как нейропатия, нефропатия, ретинопатия и сердечно-сосудистые заболевания. Для изучения этих осложнений и лежащих в их основе механизмов используются различные животные модели. Так, существует несколько экспериментальных моделей диабетической периферической нейропатии, среди которых наиболее широко используется STZ-индуцированная модель БДПН [164, 165]. Стрептозотоцин, также известный стрептозоцин ($C_{18}H_{15}N_3O_7$), был первоначально открыт в 1956 году из штаммов почвенных микроорганизмов, в частности *Streptomyces achromogens*, как новый антибиотик. Со временем он стал использоваться в качестве терапевтического препарата для лечения метастатических инсулин-продуцирующих опухолей островковых клеток [166]. Попадая в β -клетки, STZ подвергается расщеплению, что приводит к образованию карбамоилирующих и алкилирующих реактивных веществ [167], запускаются следующие процессы: (а) разрыв нити ДНК в панкреатических островках $\rightarrow$ репарация $\rightarrow$ уменьшению уровней внутриклеточного НАД и АТФ; (б) чрезмерное образование реактивных соединений кислорода, таких как супероксид, перекись водорода и гидроксильные радикалы; (в) повышение уровня оксида азота $\rightarrow$ ингибирование железосодержащей аконитазы $\rightarrow$ ограничение выработки АТФ митохондриями; (г) усиленное дефосфорилирование АТФ $\rightarrow$ увеличение мочевой кислоты, конечного продукта деградации АТФ [168]. Таким образом STZ оказывает селективное цитотоксическое действие на β -клетки поджелудочной железы. Результаты поведенческих исследований в STZ-индуцированной модели боли описаны в таблице 1.6.

Таблица 1.6 – Обобщение результатов в ответ на STZ у грызунов

Доза	Тест	Результат	Терапия	Источн ик
45 мг/кг	Электронный тест вон Фрея, тест Харгривза	Снижение порогов чувствительно сти	-	[169]
70 мг/кг в/б - крысы	Плантарный тест, тепловая ноцицептивная чувствительность, механическая толерантность, электромеханический альгезиметр Рэндалла-Селитто	У крыс с диабетом наблюдалась гипералгезия к тепловой и давящей стимуляции	-	[170]

45 мг/кг, внутри венно (хвост)	Механическую гипералгезию и аллодинию измеряли с помощью анальгезиметра Randall-Selitto и ручных нитей вон Фрея	Снижение порога механической чувствительно сти	Биоханин-А продемонстрирова л большую эффективность в устранении механической аллодинии, чем механической гипералгезии	[171]
55 мг/кг - крысы	Масса тела, оценка болевого порога (механическая аллодиния, холодовая аллодиния, механическая гипералгезия и температурная гипералгезия)	Снижение массы тела, снижение порога боли по различным параметрам оценки боли	Лечение рутином (100 и 200 мг/кг) и нимесулидом (5 и 10 мг/кг) значительно ослабляет эти изменения по сравнению с контрольными крысами	[172]
55 мг/кг (в/б) - крысы	Для оценки ноцицептивного порога и двигательной координации использовались тесты Харгривза и Ротадор	Гипералгезия и двигательный дефицит	Лечение крыс- диабетиков орексином-А (5 нМ/л) значительно ослабляло гипералгезию и двигательный дефицит у животных с диабетом.	[173]
STZ- низкая доза (25 мг/кг/д ень) пять дней подряд	Электронные тесты вон Фрея и CatWalk	Механическая гипералгезия и снижение интенсивност и отпечатков задних конечностей	-	[174]
65 мг/кг, в/б - крысы	Тепловая гипералгезия, механическая гипералгезия и скорость	Гипералгезия, аллодиния и скорость проводимости двигательного	Экстракт <i>Cucurbita pepo</i> и гидроэтаноловый экстракт <i>C. Pepo</i> значительно	[175]

Продолжение таблицы 1.6

	проводимости двигательного нерва	нерва	ослабляли поведенческие изменения, включая гипералгезию, аллодинию и изменение в скорости проведения по двигательным нервам, связанные с диабетической невропатией	
45 мг/кг, в/б - крысы	Определение порогов чувствительности	Тепловая гипералгезия	Лечение гесперидином снижало гипергликемию и термическую гипералгезию, вызванные STZ	[176]

Таким образом, стрептозотоцин-индуцированная модель болевой диабетической периферической нейропатии успешно применяют для тестирования эффективности различных терапевтических подходов. Данная модель воспроизводит ключевые симптомы, характерные для диабетической нейропатии, включая гипералгезию, аллодинию и снижение порога болевой чувствительности.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Этические аспекты проведения исследования

Данная исследовательская работа руководствуется законодательством Республики Казахстан, а именно главой 3 «Порядок обращения с животными в научно-исследовательских и учебных целях, в тестировании, в производстве, в том числе в производстве биологических препаратов» приказа Министра сельского хозяйства Республики Казахстан «Об утверждении Правил обращения с животными» от 30 декабря 2014 года № 16-02/701 [177], статьей 19 «Требования при обращении с экспериментальными (лабораторными) животными» закона Республики Казахстан «Об ответственном обращении с животными» от 30 декабря 2021 года № 97-VII ЗРК [178].

Эксперименты проводились с одобрения локальной этической комиссии (ЛЭК) Казахского национального университета имени аль-Фараби (г. Алматы, РК): заключение №IRB-377 от 24.02.2022, дополнение №IRB-A377 от 18.11.2022 (Приложение А).

2.2 Ботулинические препараты

В опытах использовали нативный инкоботулотоксин А, Xeomin® (Merz Pharma GmbH & Co. KGaA, Германия), и новый непарализующий ботулинический препарат el-iBoNT, подготовленный *Dr Charlotte Leese* из университета Шеффилд (г. Шеффилд, Великобритания), во время научно-исследовательской стажировки докторанта Жантлеуовой А.К. на базе лаборатории факультета биомедицинских наук университета Шеффилд в 2022 г. Для получения el-iBoNT, который можно представить как (1) LC-Td-syx-SpyCatcher-(2) SpyTag-НС, два рекомбинантных белка: (1) и (2), - были экспрессированы в штамме BL21(DE3) *Escherichia coli*. Трансформация компетентных клеток проводилась с помощью термического шока, используя вектор pGEX-KG. В результате экспрессии рекомбинантных белков, соединённых с глутатионом S-трансферазой (GST), возможно было провести очистку на гранулах глутатион-сефарозы (GE Healthcare, США) с последующим использованием тромбина. Дальнейшая очистка была достигнута с помощью аффинной хроматографии на колонке Superdex 200 10/200 GL (GE Healthcare, США). Выход белка составил приблизительно 200 мкг на литр бактериальной культуры. Препарат el-iBoNT собирался путем смешивания LC-Td-syx-SpyCatcher и SpyTag-НС в течение 2 часов при 4°C в буфере А. Очищенные белки были разделены на аликвоты и хранились при температуре -80°C до последующих экспериментов. Подробный протокол с использованными растворами представлен ниже.

Растворы

Буфер А:

10 мл 1М HEPES pH 7.3 (Fisher BP299 20 mM, США)

10 мл 5М NaCl (100 mM)

Довести до 500 mL H₂O

Буфер для лизиса (очистка белков):

10 mL 1M HEPES pH 7.3 (Fisher BP299 20 mM, США)

50 mL 5M NaCl (500 mM)

1 mL 0.5M EDTA (Fisher 15575020 1 mM, США)

Довести до 500 mL H₂O

Непосредственно перед использованием добавить 1 таблетку ингибитора протеазы (Roche, 5892970001, Швейцария) на 50 мл буфера.

Буфер с низким содержанием соли:

10 mL 1M HEPES pH 7.3 (Fisher BP299 20 mM, США)

10 mL 5M NaCl (100 mM)

2.5 mL 20% Triton X-100 (Fisher T/3751/08 0.1%, США)

1 mL 0.5M EDTA (Fisher 15575020 1 mM, США)

Довести до 500 mL H₂O

Буфер с высоким содержанием соли:

10 mL 1M HEPES pH 7.3 (Fisher BP299 20 mM, США)

100 mL 5M NaCl (1M)

2.5 mL 20% Triton X-100 (Fisher T/3751/08 0.1%, США)

1 mL 0.5M EDTA (Fisher 15575020 1 mM, США)

Довести до 500 mL H₂O

Питательная среда 2-YT

Растворить 16g 2-YT бульона (Invitrogen 22712020, США) в 1 L dH₂O. Перед использованием автоклавируют.

Насыщенная питательная среда 2-YT

Растворить 32g 2-YT бульона (Invitrogen 22712020, США) + 2,5g (Na₂HPO₄, Sigma S5136, США) в 1 L dH₂O. Перед использованием автоклавируют.

Разделяющий (нижний) гель:

1.33 mL dH₂O

2.0 mL 50% глицерина (стерилизованного)

2.5 mL буфера для разделяющего геля (1.5M Tris pH 8.8)

4 mL протогеля (30% (w/v) акриламида, 0.8% (w/v) бис-акриламида)

100 uL 10% SDS (в воде)

Добавить непосредственно перед заливкой геля:

80 uL 10% (w/v) персульфата аммония (APS)

8 uL TEMED

Концентрирующий (верхний) гель:

3.8 mL dH₂O

1.5 mL буфера для концентрирующего геля (0.5M Tris pH 6.8)

600 uL протогеля (30% (w/v) акриламида, 0.8% (w/v) бис-акриламида)

60 μ L 10% SDS (в воде)

Добавить непосредственно перед заливкой геля:

80 μ L 10% (w/v) персульфата аммония (APS)

8 μ L TEMED

4X загрузочный буфер для SDS-PAGE:

3,2 g SDS

20 mL 0,5M Tris-HCl, pH 6.8

640 μ L 0,5M EDTA

16 mL 50% глицерина

2,5 mL H₂O

1,5 бромфенолового синего

Для приготовления 2X загрузочного буфера разбавьте 4X загрузочный буфер равным количеством H₂O. Для приготовления 1X загрузочного буфера смешайте 1 часть 4X загрузочного буфера с 3 частями H₂O.

Протокол

Трансформация BL21-gold (DE3) pLysS компетентных клеток (Agilent 200132, США)

День 1

1. Включите водяную баню и установите температуру 42°C, предварительно охладив 1,5 mL микроцентрифужные пробирки на льду.

2. Разморозьте аликвоту клеток pLysS, используйте 30 μ L для каждой трансформации.

3. Добавьте 1 μ L ДНК (не более 10% от объема клеток) и аккуратно перемешайте. Инкубируйте 30 минут на льду.

4. Поместите на водяную баню на 30 сек, затем сразу же на лед на 5 мин.

5. Добавьте 300 μ L питательной среды 2-YT и инкубируйте в шейкере в течение 1 ч.

6. Поместите на два планшета с 50 μ g/mL хлорамфениколом и 100 μ g/mL ампициллином.

7. Инкубируйте при 37°C в течение ночи.

Низкотемпературная экспрессия и очистка слитых белков GST

День 2

1. Приготовьте 500 mL насыщенной питательной среды 2-YT в 2 L колбах Эрленмейера и отправьте в автоклав.

2. Приготовьте одну пробирку с 5 mL питательной среды 2-YT + 5 μ L хлорамфениколом и 5 μ L ампициллина для каждой колбы.

3. Добавьте бактерии, взяв одну колонию со свежего планшета с помощью инокуляционной петли, перемешайте бактерии в среде и инкубируйте в течение ночи при 37°C.

День 3

1. В каждую колбу объемом 500 mL с насыщенной питательной средой

2-УТ добавьте 500 μ L ампициллина и 500 μ L хлорамфеникола, затем влейте 5 mL ночной культуры дня 2. Инкубируйте в течение 2-4 ч при 37°C: пока оптическая плотность при 600 нм не достигнет 0,45-0,6.

2. Добавьте 500 mL 100 mM ИПТГ и инкубируйте в течение ночи при 22°C.

День 4

1. Центрифугируйте бактерии при ~4700 об/мин в течение 15 минут и перелейте супернатант в пустую колбу. Добавьте дезинфицирующее средство в отходы. Приготовьте буфер для лизиса, добавив 2 таблетки ингибиторов протеаз Ultra Complete (Roche, 5892970001, Швейцария) в 100 mL буфера для лизиса и оставив вращаться до растворения.

2. После этого работайте на льду. Суспендируйте в 10 mL буфера для лизиса. Поместите в 50 mL пробирку. Затем промойте флакон для центрифугирования дополнительным объемом 5 mL буфера для лизиса и добавьте в пробирку.

3. Заморозьте пробирку на боку в морозильной камере при температуре -80°C в течение 45 минут. Разморозьте, поместив в воду с температурой 50°C на 10 минут, затем поместите на шейкер на 1 час при 37°C.

4. Добавьте 10 μ L 1M $MgCl_2$ и 2 mg дезоксирибонуклеазы I из бычьей поджелудочной железы (Sigma DN25, США). Оставьте на шейкере при комнатной температуре на 10 мин.

5. Добавьте 3 mL 20% Triton X-100 и вращайте в течение 20 мин при 4°C.

6. Тем временем пипетируйте 0,5 mL гранул глутатион-сефарозы (GE Healthcare 17-0756, США) в пробирку объемом 15 mL (одна пробирка на 500 mL культуры). Промойте гранулы в буфере с низким содержанием соли и центрифугируйте при ~2000 об/мин, затем слейте надосадочную жидкость. Повторите дважды. Храните гранулы на льду до надобности.

7. Вылейте супернатант из шага 5 на гранулы из шага 6 и инкубируйте в центрифуге при 4°C в течение 1 ч - 1 ч 30 мин.

8. Центрифугируйте гранулы при ~2000 об/мин в течение 1 мин.

9. Промойте гранулы дважды, как в шаге 6, используя буфер с высоким содержанием соли.

10. Промойте гранулы дважды, как в шаге 6, используя буфер с низким содержанием соли.

11. Ресуспендируйте в 7 mL буфера с низким содержанием соли (до 7,5 mL).

12. Залейте гранулы глицерином до объема 15 mL и хорошо перемешайте с помощью ротатора в холодильной камере перед хранением при температуре -20°C.

Расщепление GST тромбином

День 5

На 0,5 mL белка на гранулах:

1. Промойте гранулы дважды холодным буфером А, чтобы удалить

Triton X-100, который мешает быстрой белковой жидкостной хроматографии.

2. Перенесите гранулы в микроцентрифужную пробирку объемом 2 mL.

3. Добавьте 20 μ L 250 U/mL бычьего тромбина (Sigma T6634, США) в воду и вращайте в течение 60 минут при 20°C.

4. Перенесите гранулы в спин-колонки (Generon GEN-MSF500, США) по 700 μ L за раз и центрифугируйте в течение 1 мин при >13000 об/мин, чтобы отделить гранулы от элюированного белка. Перенесите элюированный белок в новую спин-колонку и повторяйте процедуру до тех пор, пока все бусины не будут отфильтрованы.

5. Перенесите элюат на концентрационную колонку Vivaspin с соответствующим размером пор мембраны. (Sartorius - VS0201 для белков >10 кДа, VS0261 для белков >100 кДа, Германия). Для концентрирования центрифугируйте при 5000 об/мин и проверяйте каждые 5 мин, пока объем образца не составит ~ 0,5 mL. Перенесите концентрированный элюат на свежую спин-колонку (Generon GEN-MSF500, США) и прокрутите в течение 1 мин на максимальной скорости, чтобы удалить пузырьки и пену.

6. Загрузите образец на колонку Superdex 200 10/200 GL (GE Healthcare, США) и пропустите через нее буфер А со скоростью 0,5 mL/min, отбирая фракции по 500 μ L.

7. Объедините фракции и храните при -80°C.

Подготовка связанных молекул el-iBoNT

1. В буфере А смешать 1 μ M очищенного белка LHn-Spycatcher-ex с 2 мкМ белка Spytag-Hc/A. Инкубировать при ~4°C в течение 2 часов.

2. Провести 5 μ L белковой смеси на 12% Bis-Tris SDS-PAGE геле (Invitrogen NUPAGE Novex NP0343) в MES SDS буфере для электрофореза (Invitrogen NUPAGE NP0002) при 180 mV в течение 50 min. Затем окрасить гель, чтобы проверить, правильно ли образовался комплекс. Оставшуюся пробу хранить при 4°C.

3. Для дальнейшей очистки загрузить пробу на колонку для эксклюзионной хроматографии (GE Healthcare 28990944 Superdex 200 Increase 10/300 GL) и пропустить буфер А через колонку со скоростью 0,5 mL/min, собирая фракции по 500 μ L.

4. Выберите фракции, содержащие белок (это можно проверить по UV-графику), и проведите 5 μ L на 12% Bis-Tris SDS-PAGE геле (Invitrogen NUPAGE Novex NP0343) в MES SDS буфере (Invitrogen NUPAGE NP0002) при 180 mV в течение 50 min.

5. Окрасьте SDS-PAGE гель и храните полезные фракции при -80°C.

Изготовление гелей для SDS-PAGE

1. Соберите пластины для геля, убедившись, что их нижние края находятся на одном уровне (большая пластина сзади кассеты, два разделителя на верхней части большой пластины, затем маленькая пластина спереди кассеты).

2. Поместите пластины в держатель и проверьте, что их нижние края герметично прилегают к резиновому уплотнению держателя.

3. Смешайте реагенты для разделяющего геля (реагенты для концентрирующего геля также можно смешать заранее, но APS и TEMED добавляйте только перед заливкой геля).

4. Добавьте APS и TEMED в раствор для разделяющего геля, пипетируйте 5 мл этого раствора в собранные пластины.

5. До застывания геля используйте 1 мл шприц с тонкой иглой, чтобы нанести небольшой слой воды поверх разделяющего геля. Оставьте застывать на 15–20 минут.

6. Уберите излишки воды с поверхности разделяющего геля с помощью бумажной салфетки. Убедитесь, что гребни (комбы) для концентрирующего геля готовы к использованию.

7. Смешайте реагенты для концентрирующего геля (если это еще не сделано), добавьте APS и TEMED.

8. Пипетируйте раствор концентрирующего геля поверх застывшего разделяющего геля до верхнего края пластин.

9. Вставьте гребень в концентрирующий гель под углом, чтобы избежать образования пузырей. Оставьте застывать на 15–20 минут или до использования. Если гель не нужен сразу, оберните кассету (с установленным гелем) влажной салфеткой, затем пищевой пленкой, и храните при 4°C до момента использования (подходит для хранения до недели).

10. Перед использованием удалите гребень и промойте лунки водой, используя 5 мл шприц с толстой иглой.

2.3 Объект исследования

В исследовании использовали половозрелых самцов белых лабораторных крыс, рожденных и выращенных в условиях учебно-научной лабораторной базы Казахского национального университета имени аль-Фараби. Всех животных содержали в условиях естественного освещения при температуре 21–22°C в клетках с твердым полом и мягкой подстилкой по 2–3 особи. Животным была обеспечена полноценная сбалансированная по содержанию питательных веществ диета, состоящая из гранул комбинированного корма и зерновой смеси для крыс. Пища и вода предоставлялись *ad libitum*.

Перед поведенческими тестированиями животные были тщательно приучены к испытательному оборудованию и процедурам, которые проводились строго с 8:00 до 14:00.

Изначально в исследование было включено 60 крыс. Животные были разделены на две экспериментальные модели: 25 крыс для модели хронической мигрени и 35 крыс для модели болевой диабетической периферической нейропатии.

В группе ХМ одна крыса погибла до начала эксперимента, в связи с чем в дальнейшем исследовании приняли участие 24 особи. Они были распределены на 4 группы (по 6 животных в каждой) в зависимости от

вводимых препаратов:

1. CTRL (n=6): физиологический раствор + физиологический раствор;
2. CTRL-NTG (n=6): физиологический раствор + нитроглицерин (NTG), 10 мг/кг;
3. BONT-NTG (n=6): ботулотоксин типа А (BoNT/A), 5 ЕД + NTG, 10 мг/кг;
4. ELI-NTG (n=6): модифицированный ботулотоксин (el-iBoNT), 20 нг + NTG, 10 мг/кг.

В группе БДПН 5 крыс погибло, предположительно из-за гипергликемии, а еще 4 крысы были исключены из исследования, поскольку у них не развилась гипергликемия или гипералгезия. Оставшиеся 26 животных с подтвержденной гипералгезией были включены в исследование и разделены на 4 группы следующим образом:

1. CTL (n=6): физиологический раствор + физиологический раствор;
2. STZ-CTL (n=6): стрептозотцин (STZ), 45 мг/кг + физиологический раствор;
3. STZ-BONT (n=7): STZ, 45 мг/кг + BoNT/A, 5 ЕД;
4. STZ-ELI (n=7): STZ, 45 мг/кг + el-iBoNT, 20 нг.

Таким образом, окончательный анализ включал 50 животных, распределенных между двумя моделями и соответствующими экспериментальными группами.

2.4 Животные модели хронической боли

2.4.1 Нитроглицерин-индуцированная модель хронической мигрени

Эпизоды мигрени были индуцированы с помощью пяти внутрибрюшинных инъекций NTG, вводимых каждые два дня в течение девяти дней [136, стр. 270]. Крысу анестезировали в индукционной камере с помощью хлороформа. После животное извлекали и фиксировали, инсулиновый шприц (1 mL; игла 30G), вставляли в нижний правый квадрант живота под углом 30-45°, вводили необходимый объем вещества в расчете 10 mg/kg. Животное помещали в клетку для восстановления и наблюдали в течение нескольких минут. В качестве контроля использовали 0,9% физиологический раствор. Для расчета вводимого объема измеряли вес животного в день исследования. В модели использовали оборудование, реагенты и материалы в соответствии с таблицей 2.1.

Таблица 2.1 – Оборудование, реагенты и материалы, необходимые для индукции мигрени

Оборудование	Реагент	Расходный материал
Электронные весы для крыс (± 1 g)	Хлороформ (База №1 химических реактивов, РФ)	Инсулиновые шприцы (1 mL)

	Физиологический раствор (Santo, РК) Нитроглицерин (10 mg/mL; EGIS, Венгрия)	Одноразовые пеленки Вата
--	--	---------------------------------

2.4.2 Стрептозотоцин-индуцированная модель болевой диабетической периферической нейропатии

Индукция гипергликемии проводилась с помощью одной внутривенной инъекции STZ, растворенного в натрий-цитратном буфере. Крысу анестезировали в индукционной камере с помощью хлороформа. После животное извлекали и фиксировали, инсулиновый шприц (1 mL; игла 30G), вставляли в нижний правый квадрант живота под углом 30-45°, вводили необходимый объем вещества в расчете 45 mg/kg [169, стр. 2]. Животное помещали в клетку для восстановления и наблюдали в течение нескольких минут. В качестве контроля использовали натрий-цитратный буфер. Для расчета вводимого объема измеряли вес животного в день исследования. В первые 48 часов после инъекции в качестве единственного источника питья животным был доступен раствор сахарозы. Через 72 ч после инъекции проводили замер уровня глюкозы в крови, который повторяли еженедельно. Показатели выше 250 mg/dL свидетельствовали о развившейся гипергликемии. Подробный протокол с использованными растворами представлен ниже. В модели использовали оборудование, реагенты и материалы в соответствии с таблицей 2.2.

Таблица 2.2 – Оборудование, реагенты и материалы, необходимые для индукции гипергликемии

Оборудование	Реагент	Расходный материал
Электронные весы для крыс (± 1 g)	Хлороформ (База №1 химических реактивов, РФ)	Инсулиновые шприцы (1 mL)
Электронные весы для реагентов ($\pm 0,1$ mg)	Физиологический раствор (Santo, РК)	Одноразовые шприцы (2 mL)
Вытяжной шкаф	Стрептозотоцин (Sisco Research Laboratories, Индия)	Микропробирки (2 mL)
Глюкометр и тест-полоски	Моногидрат лимонной кислоты ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$; Лабхимпром, РФ)	pH-тест индикаторные лакмусовые полоски универсальные
Дозатор (20-200 μ L)	Дигридрат тринатрийцитрата ($C_8H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$; Лабхимпром, РФ)	Наконечники для дозатора на 2-200 μ L

Коническая колба (500 mL)	Сахароза	Одноразовые пеленки
Мерный стакан (50 mL)		Алюминиевая фольга
Стеклянные пробирки (10 mL)		Вата

Растворы

Натрий-цитратный буфер, pH 5.5

Растворить 210,14 mg моногидрата лимонной кислоты в 100 mL dH₂O, чтобы получить 10 mM раствор лимонной кислоты. Растворить 294,10 mg дигидрата тринатрийцитрата в 100 mL dH₂O с получением 10 mM раствора цитрата натрия. Добавлять раствор лимонной кислоты к раствору цитрата натрия до pH 5,5. Готовить непосредственно перед применением.

Раствор стрептозотоцина

Рассчитать количество стрептозотоцина, необходимое для инъекций в одном эксперименте, используя конечную дозу 45 mg/kg. Непосредственно перед использованием содержимое одной микроцентрифужной пробирки с STZ, покрытой алюминиевой фольгой, смешать с достаточным количеством натрий-цитратного буфера, чтобы получить раствор с концентрацией 50 mg/mL.

Раствор сахарозы

Растворить 100 g сахарозы в 1 L водопроводной воды. Хранить до 3 дней при температуре от 5°C до 10°C.

Протокол

Индукция гипергликемии

1. Для облегчения внутрибрюшинной абсорбции препарата за 4–6 часов до введения препарата ограничить доступ к корму.
2. Взвесить всех животных на весах.
3. Непосредственно перед использованием (т. е. в течение 15–20 минут) приготовить раствор STZ с концентрацией 50 мг/мл.
4. Набрать в шприц для инсулина объемом 1 мл с иглой 30 G раствор так, чтобы конечная доза составила 45 мг/кг.
5. Сделать инъекцию крысе сразу после наполнения шприца, чтобы свести к минимуму воздействие света на содержимое шприца.
6. Расположить инъецированных крыс в клетках с твердым полом и мягкой подстилкой.

Измерение глюкозы в крови

1. Вставить тест-полоску в глюкометр.
2. Осторожно прижать шприц для прокалывания к кончику хвоста.

3. Прикоснуться активной областью тест-полоски глюкометра к капле крови. Подождать пока глюкометр проанализирует образец крови (~ 5 секунд).

2.5 Поведенческие тесты

В NTG-индуцированной модели боли поведенческое тестирование начиналось через 30 минут после инъекции NTG с фотографирования «гримасы крысы», после следовал тест Харгривза на определение изменения порога температурной чувствительности. Электронный тест вон Фрея проводился через 4 часа после инъекции. Базовые показатели были определены за 7 дней до первой инъекции. Тесты проводились после каждой инъекции NTG на протяжении 10 дней в соответствии с рисунком 2.1А.

В STZ-индуцированной модели боли механическую аллодинию и тепловую гипералгезию оценивали один раз в неделю после инъекции STZ. Базовые показатели были определены за 2 дня до инъекции. Тесты проводились на протяжении 6 недель в соответствии с рисунком 2.1Б

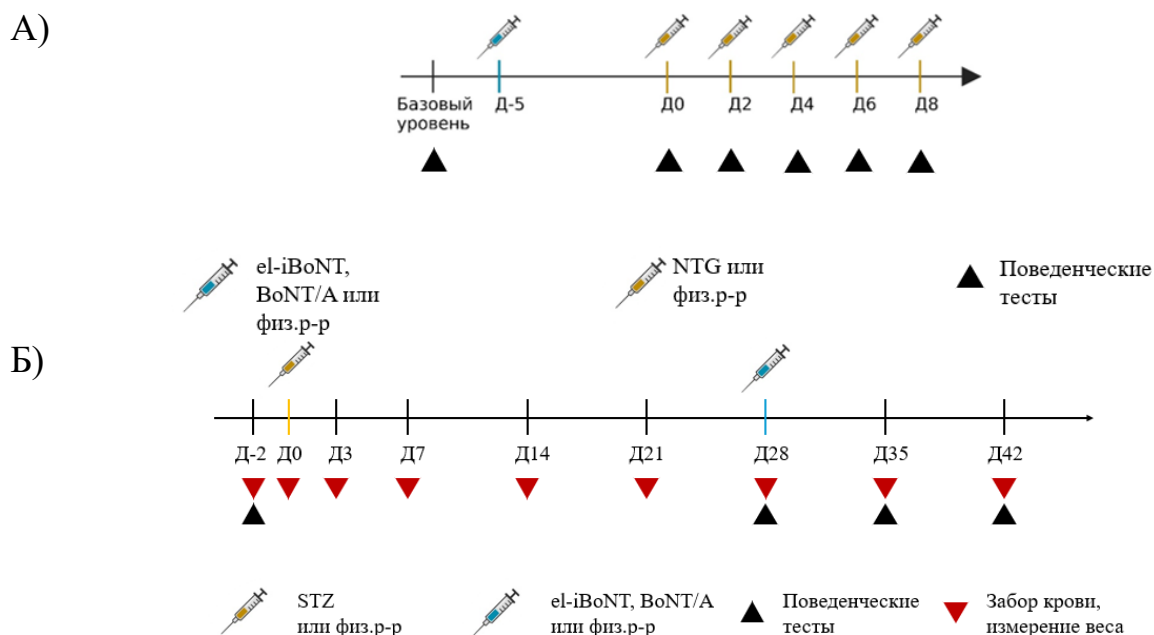


Рисунок 2.1 – Таймлайн проведения поведенческих тестов. (А) Модель ХМ; (Б) Модель БДПН

2.5.1 Электронный тест вон Фрея (механическая чувствительность)

Крыс помещали в камеры из плексигласа, расположенные на приподнятой решетке, давали им акклиматизоваться. По истечении времени акклиматизации подошвенную поверхность лапы стимулировали пластиковым наконечником аппарата вон Фрея. Порог определяли как давление, при котором крысы отрывает лапку. Измерение проводили трижды для каждого животного. Оборудование тщательно очищали после каждого использования. Для теста использовали оборудование и материалы, представленные в таблице 2.3. Подробный протокол представлен ниже.

Таблица 2.3 – Оборудование и материалы, необходимые для проведения теста вон Фрея

Оборудование	Расходный материал
Аппарат вон Фрея (BioSeb, Франция)	Бумажные полотенца
Камера для крыс со съемным верхом (2 шт.)	Дезинфицирующий раствор (70% этиловый спирт)
Приподнятая решетка	Пластиковые наконечники

Протокол

1. Удостовериться, что в комнате для оценки поведения сведены к минимуму внешние раздражители, которые могут вызвать беспокойство у животных. Настроить оборудование.

2. Поместить крыс в отдельные камеры поверх приподнятого сетчатого пола в соответствии с рисунком 2.2. Акклиматизировать животных в течение 10-15 минут. Во время первоначальных базовых измерений разрешен более длительный период акклиматизации. Повторить шаг в течение как минимум 2 дней до измерения базовых показателей.

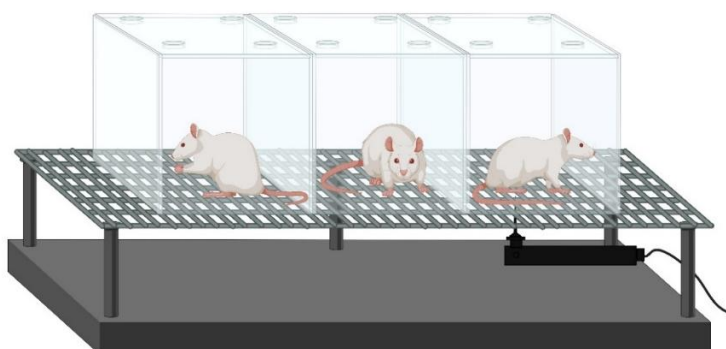


Рисунок 2.2 – Схема теста вон Фрея

(Адаптировано из «Behavioral Test Apparatus», BioRender.com (2024). Взято с сайта <https://app.biorender.com/biorender-templates>)

3. Расположить наконечник аппарата непосредственно под центром тестируемой лапы, контролируя процесс визуально, плавно увеличивать давление до тех пор, пока лапа животного не отдергнется из-за механического воздействия. Зарегистрировать давление, при котором произошло поднятие лапы. Последовательные стимулы трижды прикладываются с 3-минутным перерывом между стимуляциями.

2.5.2 Тест Харгривза (температурная чувствительность)

Крыс помещали в камеры из плексигласа, расположенные на приподнятой платформе, давали им акклиматизоваться. По истечении времени акклиматизации подошвенную поверхность лапы стимулировали тепловым

лучем. Порог определяли как время в секундах, которое крысы не отрывали лапку. Измерение проводили трижды для каждого животного. Оборудование тщательно очищали после каждого использования. Для теста использовали оборудование и материалы, представленные в таблице 2.4. Подробный протокол представлен ниже.

Таблица 2.4 – Оборудование и материалы, необходимые для проведения теста Харгривза

Оборудование	Расходный материал
Аппарат Харгривза (Ugo Basile, Италия)	Бумажные полотенца
Секундомер	Дезинфицирующий раствор (70% этиловый спирт)
Прозрачный пластиковый пол для тестовой зоны (толщиной 2 mm)	
Камера для крыс со съёмным верхом (2 шт.)	

- Протокол**
1. Удостовериться, что в комнате для оценки поведения сведены к минимуму внешние раздражители, которые могут вызвать беспокойство у животных. Настроить оборудование. Установить интенсивность инфракрасного излучения с помощью контроллера на 50 I.R.
 2. Поместить крыс в отдельные камеры поверх приподнятого прозрачного пола в соответствии с рисунком 2.3. Акклиматизировать животных в течение 10-15 минут. Во время первоначальных базовых измерений разрешен более длительный период акклиматизации. Повторить шаг в течение как минимум 2 дней до измерения базовых показателей.

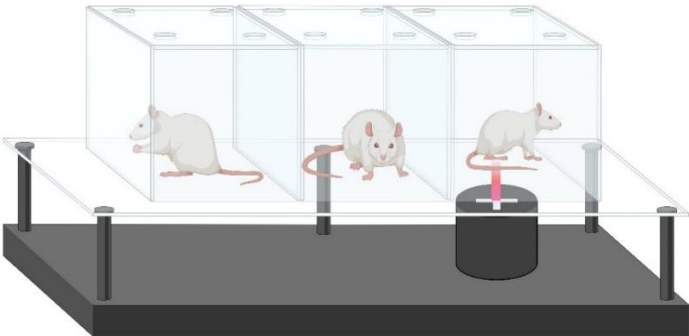


Рисунок 2.3 – Схема теста Харгривза
(Адаптировано из «Behavioral Test Apparatus», BioRender.com (2024). Взято с сайта <https://app.biorender.com/biorender-templates>)

3. Расположить инфракрасный излучатель непосредственно под центром тестируемой лапы, используя направляющие линии.

4. Начать тест, нажав кнопку СТАРТ, и наблюдать за лапой животного, пока она не отдергнется из-за теплового воздействия. Зарегистрировать время в секундах. Чтобы убедиться, что во время тестирования не произойдет повреждения тканей, было установлено максимальное пороговое значение задержки, равное 25 секундам. Последовательные стимулы трижды прикладываются с 3-минутным перерывом между стимуляциями.

Примечание – Необходимо использовать дезинфицирующий раствор и бумажные полотенца для своевременного удаления мочи и фекалий, которые могут искажать результаты эксперимента, мешая поглощению тепла и отражению луча.

2.5.3 Шкала гримасы крысы

Шкала гримасы крысы (ШГК) используется для количественной оценки боли путем изучения черт гримасы крысы по четырем отличительным признакам/функциональным единицам (Приложение Б):

1. Орбитальное сужение: сужение орбитальной области, проявляющееся либо в частичном или полном закрытии глаз, либо в их «сжатии»;
2. Сглаживание носа/щек: уменьшение выпуклости носа и щек, отсутствие складки между щеками и носом;
3. Изменение ушей: уши складываются, скручиваются и наклоняются вперед или наружу, в результате чего приобретают заостренную форму, а пространство между ушами кажется шире;
4. Изменение вибриссов: вибриссы смещаются вперед (в сторону от лица) по сравнению с исходным положением, имеют тенденцию собираться в пучок.

Проявление этих характеристик варьируется в зависимости от наличия и выраженности боли в соответствии с рисунком 2.4. Каждой из четырех функциональных единиц присваивается оценка по 3-балльной шкале, где 0 - отсутствие изменений, 1 - умеренные изменения, 2 - выраженные изменения.



Рисунок 2.4 – Сравнение гримас крысы без/с болью
(Адаптировано из «Rat Head (Lateral)», BioRender.com (2024). Взято с сайта <https://app.biorender.com/biorender-templates>)

Съемка изображений для оценки ШГК

Для оценки крыс помещали по отдельности в прозрачную камеру. Каждую крысу фотографировали с помощью устройства (64 Мрх, Sony IMX682 Exmor RS), расположенного примерно в 15–20 см от животного. Были получены снимки боковой стороны морды крысы. Крыс фотографировали на 0, 2, 4, 6, 8 дни эксперимента в модели боли, вызванной NTG, через 30 минут после инъекции, а также за 7 дней до начала эксперимента, в результате чего было получено в общей сложности 6 изображений для каждой крысы. Не использовались снимки, сделанные во время груминга, сна или активного обнюхивания. Только снимки, содержащие в фокусе все соответствующие отличительные признаки, были использованы в дальнейшем. Полученные изображения оценивались двумя независимыми исследователями. Немаркированные изображения были представлены исследователям в случайном порядке на платформе Google Forms. Оценки усреднялись по двум оценщикам, чтобы получить общий балл боли для каждой крысы.

2.6 Инъекции ботулинических препаратов

Согласно литературным данным, среднее значение пг на единицу Xeomin® составляет $4,03 \pm 0,06$ [179].

В модели NTG профилактику проводили билатеральными периорбитальными инъекциями 2,5 U Xeomin®/10 ng el-iBoNT за 7 дней до первого спровоцированного эпизода мигрени. Физиологический раствор использовали для контроля. Анестезированную хлороформом крысу располагали в положении лежа на животе хвостом от исследователя, после пальцами зажимали область над глазами, вводили препарат подкожно. Животное помещали в клетку для восстановления и наблюдения, после возвращали в обычную клетку.

В модели STZ для контроля боли проводили лечение ботулиническими препаратами на 28 день после инъекции STZ. Лечение заключалось в подошвенной инъекции 5 U Xeomin®/20 ng el-iBoNT. В качестве контроля группе крыс, которым не вводился STZ, а также группе крыс, которым не проводилось лечение, вводили физиологический раствор в объеме 0,05 mL. Анестезированное неподвижное животное помещали на рабочую поверхность в положение лежа на спине хвостом от исследователя. Глубина анестезии подтверждалась исчезновением рефлекса отдергивания в задней лапе при нажатии на лапу. Заднюю лапу очищали, используя 70% этиловый спирт, перед подкожной подошвенной инъекцией. Препарат вводили в центр стопы примерно в течение 5 секунд. После животное помещали в клетку для восстановления и наблюдали в течение 10 минут, прежде чем вернуть в обычную клетку.

Кроме того, новый ботулинический препарат el-iBoNT (50 нг, 100 нг и 150 нг) вводили в икроножную мышцу крыс для визуальной оценки паралитической активности молекул *in vivo*. Крыс фотографировали спустя 72 ч после инъекции.

2.7 Статистические методы

Статистический анализ был выполнен с использованием программы Prism 10.1.1, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA и IBM SPSS Statistics for Windows, Version 29.0.1.0 Armonk, NY, USA. Значения представлены в виде средних значений (MEAN) $\pm$ стандартной ошибки (S.E.M.). Двусторонний ANOVA со множественными измерениями использовался для определения статистической значимости поведенческих результатов. Статистическая значимость была определена как $P < 0.05$.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Структурная характеристика нового непарализующего ботулинического нейротоксина el-iBoNT

Нейротоксин el-iBoNT был сконструирован с использованием изопептидной связи между модифицированными доменами LC-Td и HC. Методы конструирования и очистки подробно описаны в разделе 2.2 «Ботулинические препараты». Кратко, LC-Td (аминокислоты 1–873) был соединен с модулем синтаксина 1A (аминокислоты 2–160) и SpyCatcher, а HC (аминокислоты 874–1296) — с модулем SpyTag. После экспрессии и очистки в *E. coli* оба компонента были объединены, что привело к образованию стабильного белка в соответствии с рисунком 3.1. Ниже представлены данные электрофореза, демонстрирующие массу нового белка по сравнению с нативным нейротоксином BoNT/A.

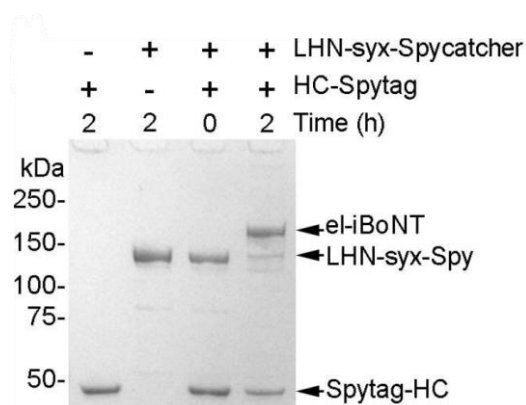


Рисунок 3.1 – Очищенные белки и спонтанная сборка el-iBoNT в SDS-PAGE

Дополнительно представлено схематическое изображение нового белка. Длина и масса el-iBoNT составляют 22,8 нм и 182 255 Да, что выше, чем у нативного токсина 12,5 нм и 149 425 Да в соответствии с рисунком 3.2.

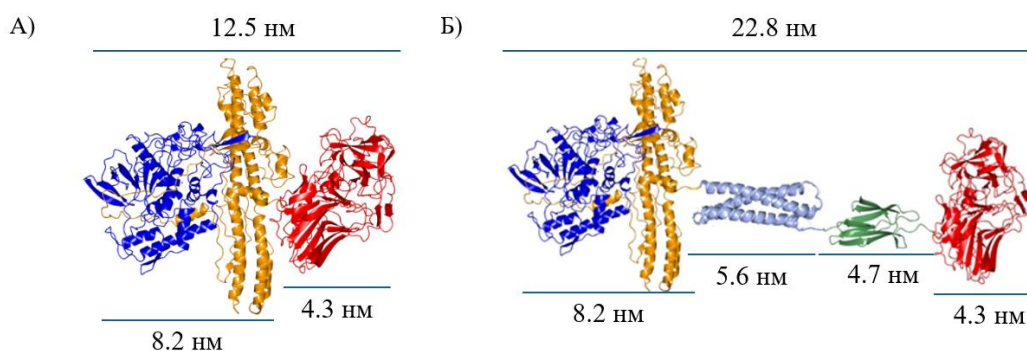


Рисунок 3.2 – Изменение пространственных параметров el-iBoNT.

А) Структура нативного ботулинического нейротоксина типа А;

Б) Структура el-iBoNT

В предыдущих исследованиях [97-104] были описаны аналогичные удлинённые молекулы ботулинического нейротоксина, например, BiTox/A, BiTox/AA, Tetbot, SP-Bot и Derm-Bot. Отличием представленной молекулы el-iBoNT, является использование технологии SpyTag-SpyCatcher, создающей ковалентную изопептидную связь между компонентами нейротоксина. В исследовании Leese [105, стр. 3] результаты показали, что степень расщепления SNAP25 в культуре нейронов дорсального корневого ганглия при использовании el-iBoNT была сопоставима с BoNT/A, что подтверждает сохранение активности и эффективность модифицированного токсина *in vitro*.

3.2 Определение паралитической активности нового непарализующего ботулинического нейротоксина el-iBoNT

Leese и др. [105, стр. 3] исследовали паралитическую активность изопептидно-связанных молекул BoNT с помощью электромиографии и выяснили, что у животных, которым вводили BoNT, наблюдался значительный двигательный дефицит, в то время как в случае el-iBoNT двигательная функция не отличалась от исходного значения.

Учитывая эти данные, в нашем исследовании были использованы более высокие дозы, а именно 50 нг, 100 нг и 150 нг в соответствии с рисунком 3.3. Так как считается, что BoNT в полной мере проявляет свою SNAP-25-расщепляющую активность и, следовательно, паралитическое действие на 3-й день после инъекции, визуальную оценку паралитической активности новой молекулы проводили через 72 часа после введения el-iBoNT в икроножную мышцу взрослых крыс с помощью фотографирования животных. Для контроля использовали нативный ботулинический нейротоксин типа А (20 Ед).

Было продемонстрировано, при введении до 150 нг нового препарата в правую икроножную мышцу крысы не проявляли никаких симптомов двигательной дисфункции и сохраняли нормальную подвижность. Однако у крыс, подвергнутых воздействию 20 Ед BoNT/A, пальцы на ипсилатеральной лапе были сжаты, нога вытянута и не выдерживала вес крысы. Животные совершали прыжковые движения и испытывали трудности с равновесием при стоянии на задних лапах.

Молекула el-iBoNT отличается от нативного нейротоксина BoNT/A главным образом наличием соединяющего элемента –*syx*–SpyCatcher–SpyTag–, который увеличивая размер молекулы почти вдвое, снижает ее способность проникать в узкие длинные нейромышечные синапсы, тем самым ингибируя паралитический эффект, тогда как в сенсорных нейронах, где нервные окончания остаются открытыми, новый нейротоксин остается все также эффективен.

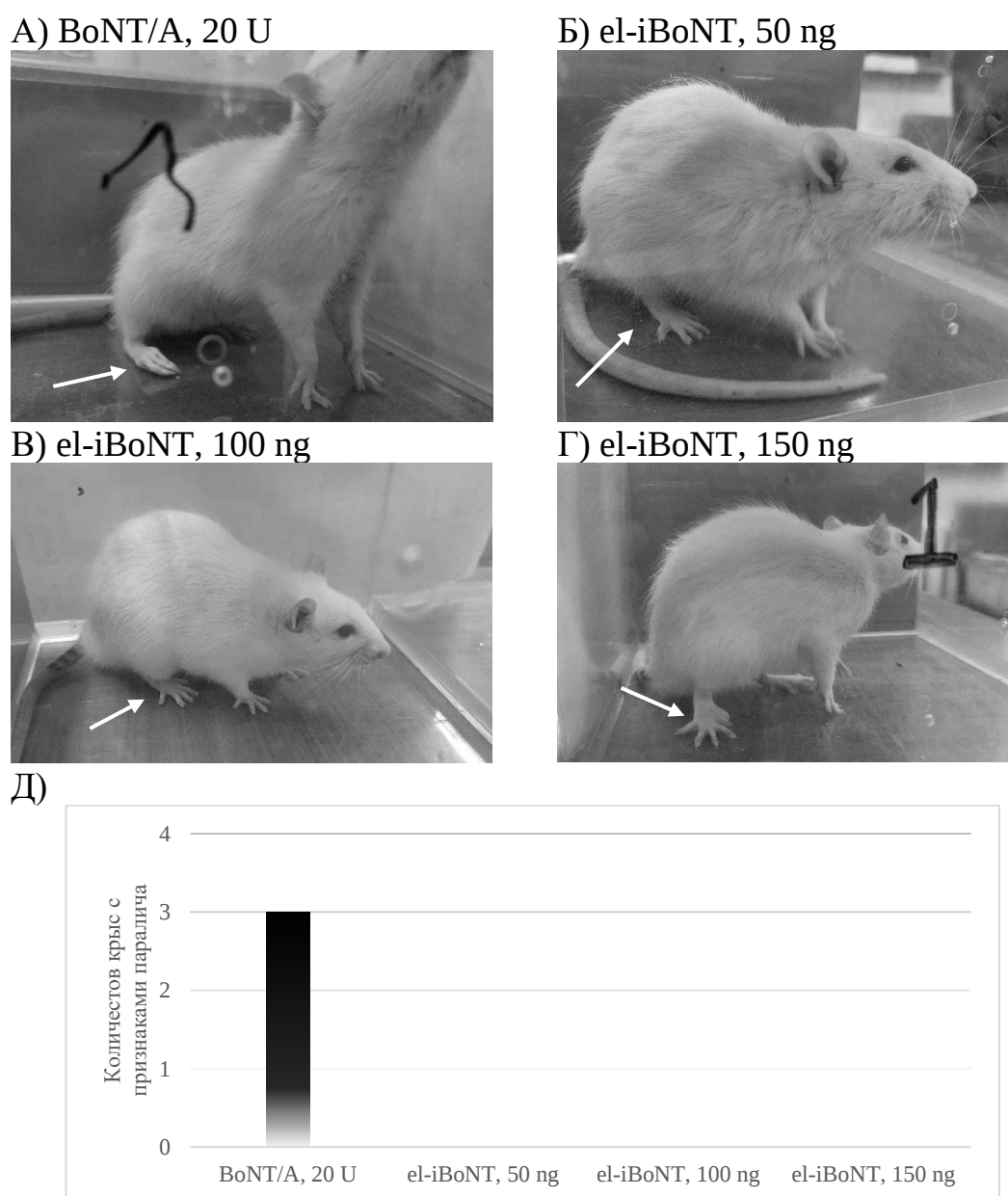


Рисунок 3.3 – Изображение крыс 72 часа спустя после инъекции. (А) BoNT/A (20 Ед); (Б-Г) el-iBoNT (50 нг, 100 нг, 150 нг) в правую икроножную мышцу; (Д) Гистограмма, показывающая количество крыс, на которых заметно повлияли инъекции (n = 3)

Таким образом, молекула el-iBoNT представляет собой перспективный инструмент для применения при хронической боли, где использование ботулинического нейротоксина ограничивается его паралитическим эффектом. el-iBoNT удовлетворяет потребность в создании BoNT, которые не вызывают паралич, но при этом эффективно воздействуют на сенсорные нейроны, что позволяет применять более высокие дозы для достижения более выраженного анальгетического эффекта.

Данная молекула была протестирована на модели нейропатической боли у крыс с повреждением нерва [105, стр. 4], используя наблюдательный анализ

и поведенческий тест фон Фрея. Результаты показали, что животные, получившие инъекции el-iBoNT, демонстрировали снижение механической гиперчувствительности и более естественное поведение при ходьбе. Примечательно, что иммуногистохимический анализ тканей спинного мозга и дорсальных корешковых ганглиев не выявил расщепленного SNAP25, что говорит об отсутствии транслокации молекулы в эти области после локальных инъекций. Однако внутриплантарное введение el-iBoNT в дозировке 20 нг способствовало снижению активации микроглии. Это свидетельствует о том, что периферические инъекции el-iBoNT могут положительно влиять на центральные процессы обработки боли, связанные с повреждением нерва.

3.3 Результаты лечения болевой гиперчувствительности в модели хронической мигрени

Методы, использованные для индукции ХМ, оценки чувствительности, а также лечения, описаны в главах 2.4.1 «Нитроглицерин-индуцированная модель хронической мигрени», 2.5 «Поведенческие тесты», 2.6 «Инъекции ботулинических препаратов».

Животных (n=24) разделили на 4 группы, в соответствии с вводимыми препаратами и рисунком 3.4.

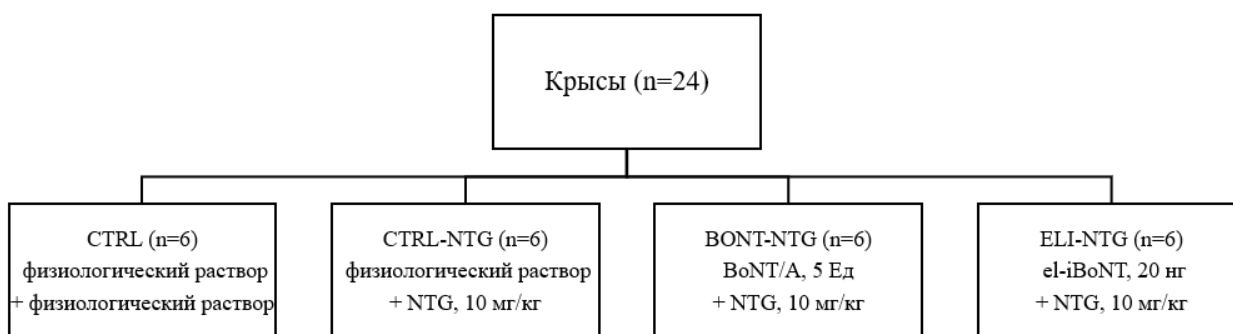
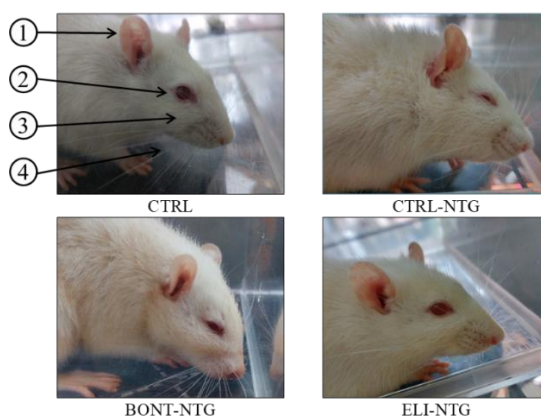


Рисунок 3.4 – Разделение крыс на группы в модели хронической мигрени

3.3.1 Шкала гримасы крысы

Было получено 144 изображения (24 крысы, базовые показатели + 5 сессий; Таблицы 3.1–3.4), которые оценивались двумя независимыми исследователями в соответствии с информационной памяткой от NC3RS (Приложение Б). Немаркированные изображения были представлены исследователям в случайном порядке на платформе Google Forms. Каждое изображение оценивалось по шкале от 0 до 2 по орбитальному сужению, сглаживанию носа/щек, изменению ушей, изменению вибриссов в соответствии с рисунком 3.5. Оценки усреднялись по двум оценщикам, чтобы получить общий балл боли для каждой крысы.



Примечания

1 1 – изменение ушей, 2 – орбитальное сужение, 3 – сглаживание носа/щеки, 4 – изменение вибрисс;

2 CTRL (n=6) – группа физраствор+физраствор, CTRL-NTG (n=6; NTG, 10 мг/кг) – группа физраствор+NTG, BONT-NTG (n=6; NTG, 10 мг/кг) – группа BoNT/A+NT, ELI-NTG (n=6; BoNT/A, 5 Ед + NTG, 10 мг/кг) – группа el-iBoNT+NTG (el-iBoNT, 20 нг + NTG, 10 мг/кг).

Рисунок 3.5 – Репрезентативные изображения гримас крыс

Таблица 3.1 – Изображения, использованные для оценки по ШГК в модели экспериментальной ХМ. Группа CTRL

№	БП	День 0	День 2	День 4	День 6	День 8
1						
2						
3						
4						
5						

Продолжение таблицы 3.1

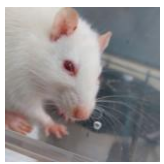
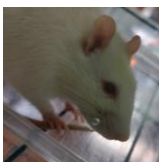
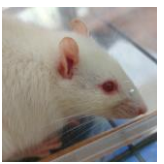
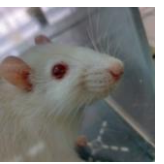
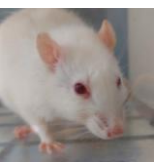
6						
Примечания 1 БП – базовые показатели; 2 Изображения получены через 30 минут после инъекции физраствора/ NTG на день 0 (1 сессия), день 2 (2 сессия), день 4 (3 сессия), день 6 (4 сессия) и день 8 (5 сессия); 3 CTRL (n=6) – группа физраствор+физраствор.						

Таблица 3.2 – Изображения, использованные для оценки по ШГК в модели экспериментальной ХМ. Группа CTRL-NTG

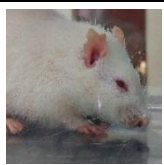
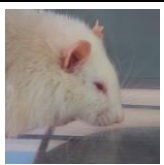
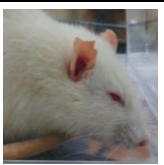
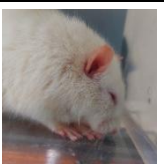
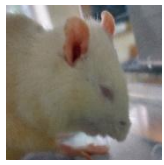
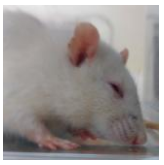
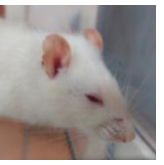
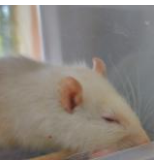
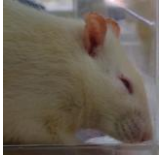
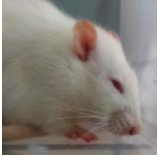
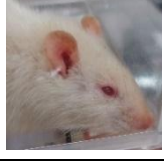
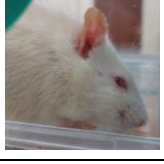
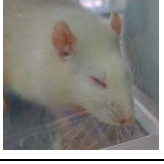
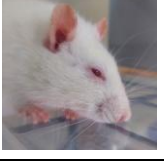
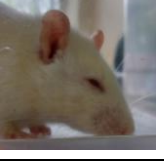
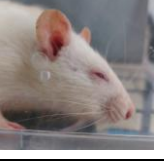
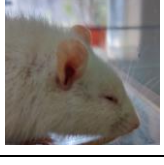
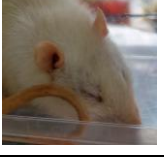
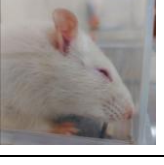
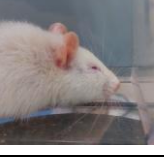
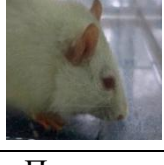
№	БП	День 0	День 2	День 4	День 6	День 8
1						
2						
3						
4						
5						
6						
Примечания 1 БП – базовые показатели; 2 Изображения получены через 30 минут после инъекции физраствора/ NTG на день 0 (1 сессия), день 2 (2 сессия), день 4 (3 сессия), день 6 (4 сессия) и день 8 (5 сессия); 3 CTRL-NTG (n=6) – группа физраствор+NTG.						

Таблица 3.3 – Изображения, использованные для оценки по ШГК в модели экспериментальной ХМ. Группа BONT-NTG

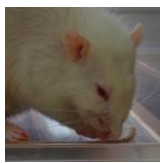
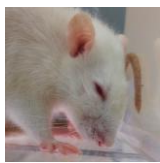
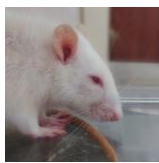
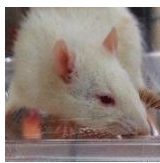
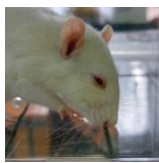
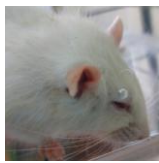
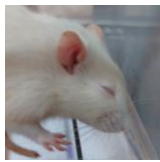
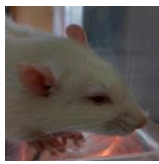
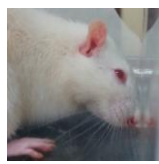
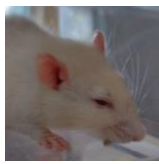
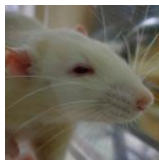
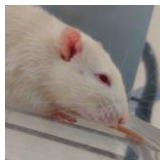
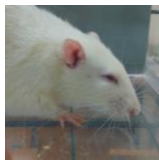
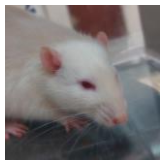
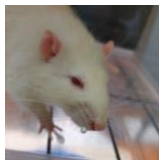
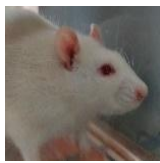
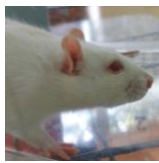
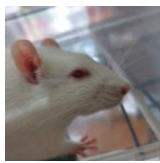
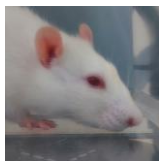
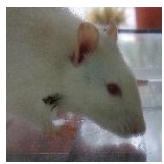
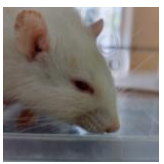
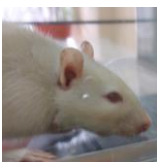
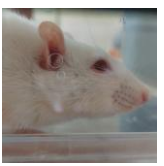
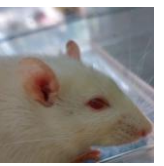
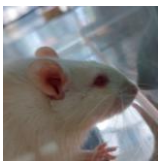
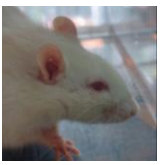
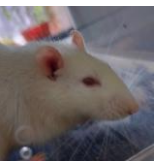
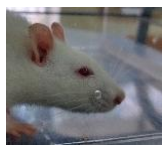
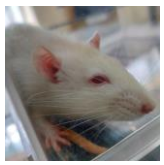
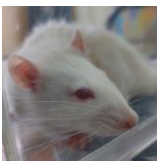
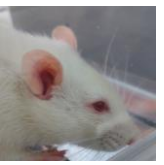
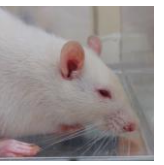
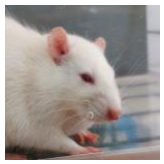
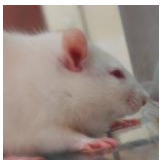
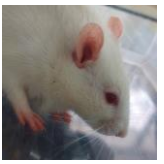
№	БП	День 0	День 2	День 4	День 6	День 8
1						
2						
3						
4						
5						
6						
Примечания 1 БП – базовые показатели; 2 Изображения получены через 30 минут после инъекции физраствора/ NTG на день 0 (1 сессия), день 2 (2 сессия), день 4 (3 сессия), день 6 (4 сессия) и день 8 (5 сессия); 3 BONT-NTG (n=6) – группа BoNT/A+NTG.						

Таблица 3.4 – Изображения, использованные для оценки по ШГК в модели экспериментальной ХМ. Группа ELI-NTG

№	БП	День 0	День 2	День 4	День 6	День 8
1						

Продолжение таблицы 3.4

2						
3						
4						
5						
6						
Примечания 1 БП – базовые показатели; 2 Изображения получены через 30 минут после инъекции физраствора/ NTG на день 0 (1 сессия), день 2 (2 сессия), день 4 (3 сессия), день 6 (4 сессия) и день 8 (5 сессия); 3 УДШ-ТЕП (т=6) – группа уд-шИщТЕ+ТЕПю						

Оценку межрейтинговой надежности проводили с помощью коммерческого программного обеспечения IBM SPSS Statistics for Windows, Version 29.0.1.0 Armonk, NY, USA. Внутрикласовой коэффициент корреляции (альфа Кронбаха) был рассчитан для каждой функциональной единицы и для общего балла ШГК. Интерпретация коэффициента была основана на методике Landis и Koch [180], где оценка $>0,81$ считалась «отличной», $0,8-0,61$ – «хорошей», $0,6-0,41$ – «умеренной», $0,4-0,21$ – «удовлетворительной», $<0,2$ – «плохой». Надежность и согласованность между двумя оценщиками колебалась в зависимости от оцениваемой функциональной единицы (Таблица 3.5).

Таблица 3.5 – Внутриклассовый коэффициент корреляции (α Кронбаха)

Функциональная единица	Внутриклассовая корреляция	95% доверительный интервал	
		Нижняя граница	Верхняя граница
Орбитальное сужение	0,93	0,90	0,95
Сглаживание ушей	0,72	0,62	0,80

Изменение вибриссов	0,50	0,30	0,64
Изменение носа/щек	0,54	0,37	0,67
Общий балл по ШГК	0,81	0,73	0,86

Общий коэффициент α Кронбаха составил 0,81, при наиболее высоком показателе у орбитального сужения (0,93). Таким образом, орбитальное сужение и даже общий балл ШГК продемонстрировали «отличную» надежность между оценщиками, изменение ушей – «хорошую», когда как сглаживание носа/щек и изменение вибриссов – «умеренную» надежность.

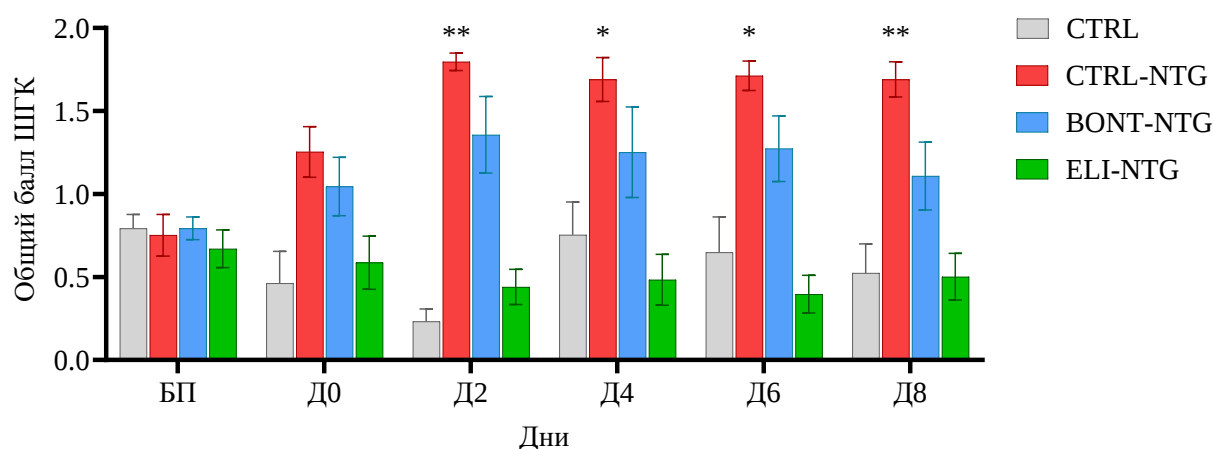
Дальнейший анализ проводили с помощью коммерческого программного обеспечения Prism 10.1.1, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA. Использовали двухсторонний дисперсионный анализ ANOVA с повторными измерениями. За статистически значимые изменения принимали уровень достоверности $p < 0,05$. Внутригрупповое сравнение показало статистически значимые изменения общего балла ШГК и балла по орбитальному сужению в группе CTRL-NTG в дни Д2, Д4, Д6 и Д8. Кроме того, балл орбитального сужения группы BONT-NTG в день Д6 также статистически отличался от БП (Таблицы 3.6, 3.7) в соответствии с рисунками 3.6-3.7.

Таблица 3.6 – Внутригрупповые сравнения (с исходным уровнем) показателей ШГК во всех временных точках

	р-критерий	[95% CI]	Значимость
CTRL			
БП vs. Д0	0,4835	-0,41 – 1,07	ns
БП vs. Д2	0,0811	-0,08 – 1,20	ns
БП vs. Д4	0,9995	-0,54 – 0,62	ns
БП vs. Д6	0,9555	-0,63 – 0,92	ns
БП vs. Д8	0,3990	-0,27 – 0,81	ns
CTRL-NTG			
БП vs. Д0	0,0547	-1,02 – 0,012	ns
БП vs. Д2	0,0031	-1,59 – -0,50	**
БП vs. Д4	0,0191	-1,68 – -0,20	*
БП vs. Д6	0,0103	-1,61 – -0,31	*
БП vs. Д8	0,0031	-1,43 – -0,45	**
BONT-NTG			
БП vs. Д0	0,8606	-1,22 – 0,72	ns
БП vs. Д2	0,2102	-1,43 – 0,30	ns
БП vs. Д4	0,6147	-1,66 – 0,74	ns
БП vs. Д6	0,2956	-1,32 – 0,36	ns
БП vs. Д8	0,7881	-1,37 – 0,74	ns
ELI-NTG			
БП vs. Д0	0,9979	-0,81 – 0,98	ns

Продолжение таблицы 3.6

БП vs. Д2	0,3602	-0,21 – 0,67	ns
БП vs. Д4	0,9061	-0,62 – 1,00	ns
БП vs. Д6	0,2721	-0,19 – 0,74	ns
БП vs. Д8	0,9183	-0,59 – 0,93	ns
Примечания 1 БП – базовые показатели; 2 Д0 – день 0, сессия 1, Д2 – день 2, сессия 2, Д4 – день 4, сессия 3, Д6 – день 6, сессия 4, Д8 – день 8, сессия 5; 3 CTRL (n=6) – группа физраствор+физраствор, CTRL-NTG (n=6; NTG, 10 мг/кг) – группа физраствор+NTG, BONT-NTG (n=6; NTG, 10 мг/кг) – группа BoNT/A+NTG, ELI-NTG (n=6; BoNT/A, 5 Ед + NTG, 10 мг/кг) – группа el-iBoNT+NTG (el-iBoNT, 20 нг + NTG, 10 мг/кг).			



Примечания

1 БП – базовые показатели;

2 Д0 – день 0, сессия 1, Д2 – день 2, сессия 2, Д4 – день 4, сессия 3, Д6 – день 6, сессия 4, Д8 – день 8, сессия 5;

3 CTRL (n=6) – группа физраствор+физраствор, CTRL-NTG (n=6; NTG, 10 мг/кг) – группа физраствор+NTG, BONT-NTG (n=6; NTG, 10 мг/кг) – группа BoNT/A+NTG, ELI-NTG (n=6; BoNT/A, 5 Ед + NTG, 10 мг/кг) – группа el-iBoNT+NTG (el-iBoNT, 20 нг + NTG, 10 мг/кг);

4 Астериск над столбиками указывает на внутригрупповые различия по сравнению с исходным уровнем. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

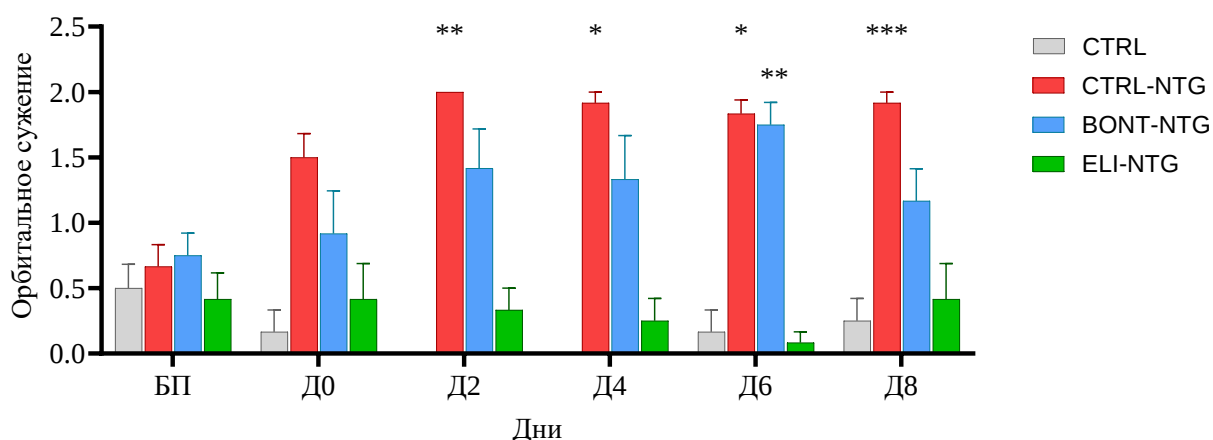
Рисунок 3.6 – Внутригрупповое сравнение общего балла по ШГК

Таблица 3.7 – Внутригрупповые сравнения (с исходным уровнем) показателей орбитального сужения во всех временных точках

	р-критерий	[95% CI]	Значимость
CTRL			
БП vs. Д0	0,4473	-0,3777 – 1,044	ns
БП vs. Д2	0,2170	-0,2788 – 1,279	ns
БП vs. Д4	0,2170	-0,2788 – 1,279	ns

Продолжение таблицы 3.7

БП vs. Д6	0,4473	-0,3777 – 1,044	ns
БП vs. Д8	0,8358	-0,6633 – 1,163	ns
CTRL-NTG			
БП vs. Д0	0,2230	-2,144 – 0,4777	ns
БП vs. Д2	0,0034	-2,044 – -0,6223	**
БП vs. Д4	0,0139	-2,163 – -0,3367	*
БП vs. Д6	0,0337	-2,221 – -0,1121	*
БП vs. Д8	0,0007	-1,727 – -0,7731	***
BONT-NTG			
БП vs. Д0	0,9939	-1,589 – 1,255	ns
БП vs. Д2	0,5564	-2,288 – 0,9546	ns
БП vs. Д4	0,7849	-2,524 – 1,357	ns
БП vs. Д6	0,0040	-1,551 – -0,4493	**
БП vs. Д8	0,7354	-1,698 – 0,8651	ns
ELI-NTG			
БП vs. Д0	>0,9999	-1,231 – 1,231	ns
БП vs. Д2	0,9912	-0,5722 – 0,7388	ns
БП vs. Д4	0,9939	-1,255 – 1,589	ns
БП vs. Д6	0,4473	-0,3777 – 1,044	ns
БП vs. Д8	>0,9999	-1,231 – 1,231	ns
Примечания 1 БП – базовые показатели; 2 Д0 – день 0, сессия 1, Д2 – день 2, сессия 2, Д4 – день 4, сессия 3, Д6 – день 6, сессия 4, Д8 – день 8, сессия 5; 3 CTRL (n=6) – группа физраствор+физраствор, CTRL-NTG (n=6; NTG, 10 мг/кг) – группа физраствор+NTG, BONT-NTG (n=6; NTG, 10 мг/кг) – группа BoNT/A+NTG, ELI-NTG (n=6; BoNT/A, 5 Ед + NTG, 10 мг/кг) – группа el-iBoNT+NTG (el-iBoNT, 20 нг + NTG, 10 мг/кг).			



Примечания

- 1 БП – базовые показатели;
 2 Д0 – день 0, сессия 1, Д2 – день 2, сессия 2, Д4 – день 4, сессия 3, Д6 – день 6, сессия 4,

Д8 – день 8, сессия 5;

3 CTRL (n=6) – группа физраствор+физраствор, CTRL-NTG (n=6; NTG, 10 мг/кг) – группа физраствор+NTG, BONT-NTG (n=6; NTG, 10 мг/кг) – группа BoNT/A+NTG, ELI-NTG (n=6; BoNT/A, 5 Ед + NTG, 10 мг/кг) – группа el-iBoNT+NTG (el-iBoNT, 20 нг + NTG, 10 мг/кг);

4 Астериск над столбиками указывает на внутригрупповые различия по сравнению с исходным уровнем. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

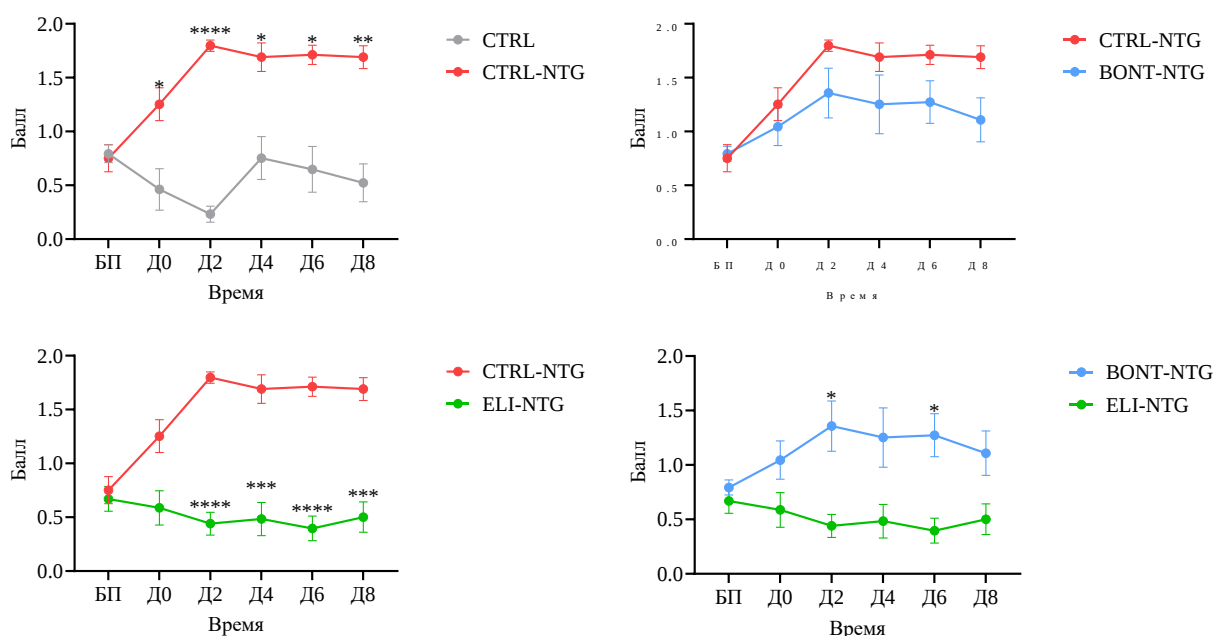
Рисунок 3.7 – Внутригрупповое сравнение орбитального сужения

Группы CTRL и CTRL-NTG продемонстрировали значимые различия при межгрупповом сравнении ШГК и орбитального сужения на Д0-Д8. При сравнении групп CTRL-NTG и BONT-NTG не было обнаружено значимых различий на протяжении всего эксперимента. Различия между группами CTRL-NTG и ELI-NTG достигли статистической значимости в большинстве случаев (Д2-Д8 для ШГК, Д0-Д8 для орбитального сужения). Животные группы ELI-NTG также демонстрировали статистически значимые низкие показатели ШГК по сравнению с BONT-NTG (Д2, Д6 для ШГК, Д6 для орбитального сужения; Таблицы 3.8, 3.9) в соответствии с рисунками 3.8-3.9.

Таблица 3.8 – Межгрупповое сравнение показателей ШГК во всех временных точках

	р-критерий	[95% CI]	Значимость
CTRL vs. CTRL-NTG			
БП	0,9920	-0,4314 – 0,5147	ns
Д0	0,0406	-1,550 – -0,03293	*
Д2	<0,0001	-1,851 – -1,279	****
Д4	0,0159	-1,686 – -0,1873	*
Д6	0,0114	-1,838 – -0,2891	*
Д8	0,0019	-1,821 – -0,5124	**
CTRL-NTG vs. BONT-NTG			
БП	0,9907	-0,5029 – 0,4195	ns
Д0	0,8063	-0,5042 – 0,9209	ns
Д2	0,3406	-0,4016 – 1,282	ns
Д4	0,5099	-0,5543 – 1,431	ns
Д6	0,2657	-0,2800 – 1,157	ns
Д8	0,1350	-0,1685 – 1,332	ns
CTRL-NTG vs. ELI-NTG			
БП	0,9613	-0,4373 – 0,6007	ns
Д0	0,0532	-0,008581 – 1,342	ns
Д2	<0,0001	0,9697 – 1,744	****
Д4	0,0007	0,5854 – 1,828	***
Д6	<0,0001	0,8700 – 1,760	****
Д8	0,0003	0,6412 – 1,735	***
BONT-NTG vs. ELI-NTG			

БП	0,7921	-0,3003 – 0,5469	ns
Д0	0,2760	-0,2690 – 1,186	ns
Д2	0,0338	0,07739 – 1,756	*
Д4	0,1431	-0,2353 – 1,772	ns
Д6	0,0205	0,1469 – 1,606	*
Д8	0,1392	-0,1720 – 1,385	ns
Примечания 1 БП – базовые показатели; 2 Д0 – день 0, сессия 1, Д2 – день 2, сессия 2, Д4 – день 4, сессия 3, Д6 – день 6, сессия 4, Д8 – день 8, сессия 5; 3 CTRL (n=6) – группа физраствор+физраствор, CTRL-NTG (n=6; NTG, 10 мг/кг) – группа физраствор+NTG, BONT-NTG (n=6; NTG, 10 мг/кг) – группа BoNT/A+NTG, ELI-NTG (n=6; BoNT/A, 5 Ед + NTG, 10 мг/кг) – группа el-iBoNT+NTG (el-iBoNT, 20 нг + NTG, 10 мг/кг).			



Примечания

1 БП – базовые показатели;

2 Д0 – день 0, сессия 1, Д2 – день 2, сессия 2, Д4 – день 4, сессия 3, Д6 – день 6, сессия 4, Д8 – день 8, сессия 5;

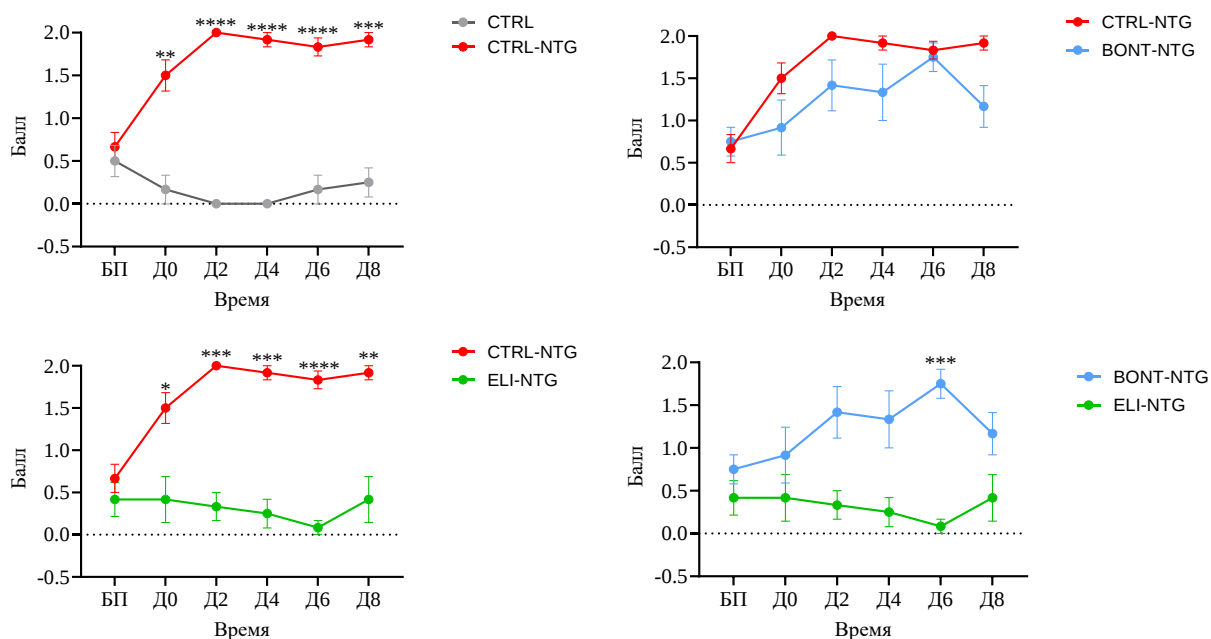
3 CTRL (n=6) – группа физраствор+физраствор, CTRL-NTG (n=6; NTG, 10 мг/кг) – группа физраствор+NTG, BONT-NTG (n=6; NTG, 10 мг/кг) – группа BoNT/A+NTG, ELI-NTG (n=6; BoNT/A, 5 Ед + NTG, 10 мг/кг) – группа el-iBoNT+NTG (el-iBoNT, 20 нг + NTG, 10 мг/кг);

4 Астериск над столбиками указывает на внутригрупповые различия по сравнению с исходным уровнем. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

Рисунок 3.8 - Межгрупповое сравнение общего балла по ШГК

Таблица 3.9 – Межгрупповое сравнение показателей по орбитальному сужению во всех временных точках

	р-критерий	[95% CI]	Значимость
CTRL vs. CTRL-NTG			
БП	0,9045	-0,9241 to 0,5908	ns
Д0	0,0015	-2,091 to -0,5759	**
Д2	<0,0001		****
Д4	<0,0001	-2,224 to -1,609	****
Д6	<0,0001	-2,291 to -1,043	****
Д8	0,0002	-2,290 to -1,043	***
CTRL-NTG vs. BONT-NTG			
БП	0,9845	-0,8135 to 0,6468	ns
Д0	0,4517	-0,6217 to 1,788	ns
Д2	0,3198	-0,5253 to 1,692	ns
Д4	0,4043	-0,6317 to 1,798	ns
Д6	0,9744	-0,5536 to 0,7202	ns
Д8	0,0983	-0,1474 to 1,647	ns
CTRL-NTG vs. ELI-NTG			
БП	0,7753	-0,5530 to 1,053	ns
Д0	0,0387	0,05668 to 2,110	*
Д2	0,0007	1,052 to 2,282	***
Д4	0,0002	1,043 to 2,290	***
Д6	<0,0001	1,335 to 2,165	****
Д8	0,0076	0,5141 to 2,486	**
BONT-NTG vs. ELI-NTG			
БП	0,6037	-0,4766 to 1,143	ns
Д0	0,6542	-0,8080 to 1,808	ns
Д2	0,0549	-0,02313 to 2,190	ns
Д4	0,0819	-0,1365 to 2,303	ns
Д6	0,0002	1,043 to 2,290	***
Д8	0,2363	-0,3747 to 1,875	ns
Примечания			
1 БП – базовые показатели;			
2 Д0 – день 0, сессия 1, Д2 – день 2, сессия 2, Д4 – день 4, сессия 3, Д6 – день 6, сессия 4, Д8 – день 8, сессия 5;			
3 CTRL (n=6) – группа физраствор+физраствор, CTRL-NTG (n=6; NTG, 10 мг/кг) – группа физраствор+NTG, BONT-NTG (n=6; NTG, 10 мг/кг) – группа BoNT/A+NTG, ELI-NTG (n=6; BoNT/A, 5 Ед + NTG, 10 мг/кг) – группа el-iBoNT+NTG (el-iBoNT, 20 нг + NTG, 10 мг/кг).			



Примечания

1 БП – базовые показатели;

2 Д0 – день 0, сессия 1, Д2 – день 2, сессия 2, Д4 – день 4, сессия 3, Д6 – день 6, сессия 4, Д8 – день 8, сессия 5;

3 CTRL (n=6) – группа физраствор+физраствор, CTRL-NTG (n=6; NTG, 10 мг/кг) – группа физраствор+NTG, BONT-NTG (n=6; NTG, 10 мг/кг) – группа BoNT/A+NTG, ELI-NTG (n=6; BoNT/A, 5 Ед + NTG, 10 мг/кг) – группа el-iBoNT+NTG (el-iBoNT, 20 нг + NTG, 10 мг/кг);

4 Астериск над указывает на внутригрупповые различия. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

Рисунок 3.9 - Межгрупповое сравнение орбитального сужения

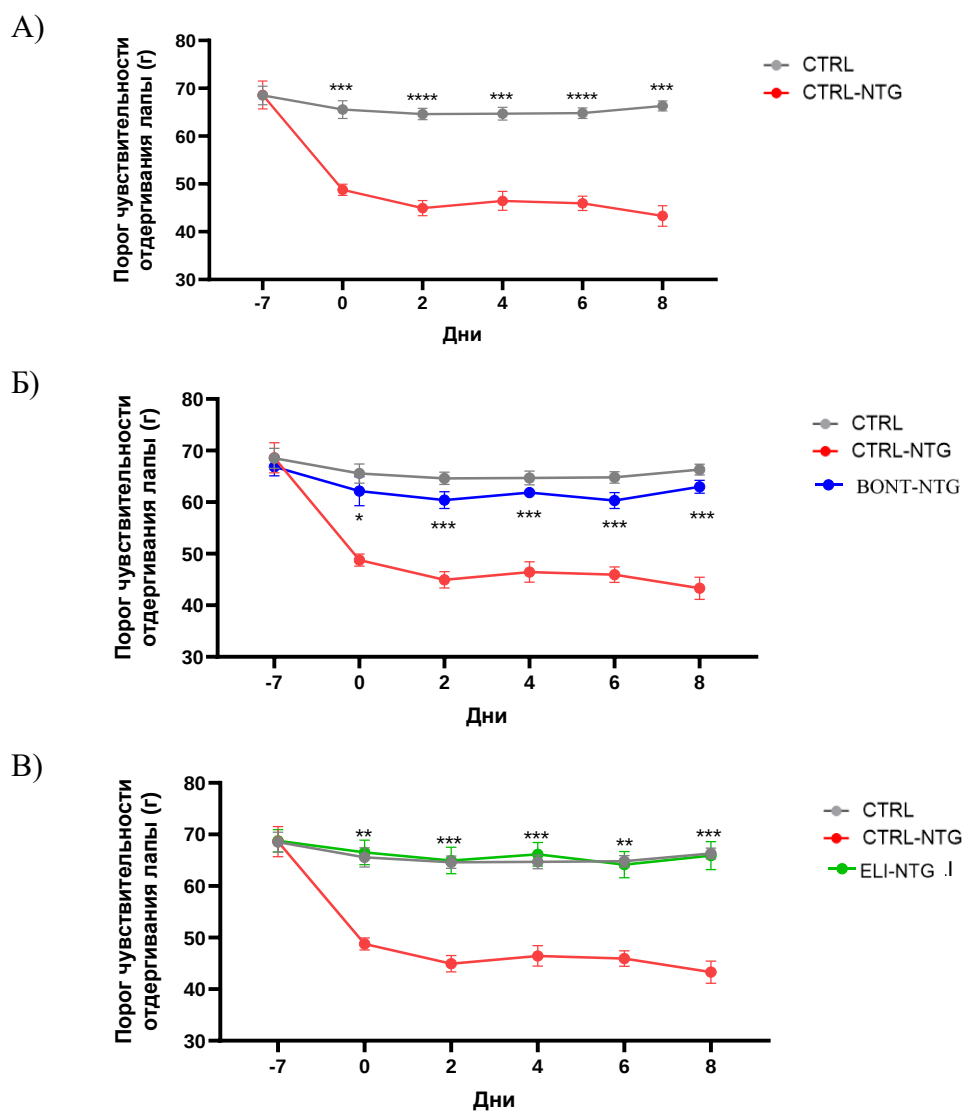
Как отмечал *Harris* [152, стр. 69], «орбитальное сужение является одним из четырех признаков, составляющих шкалу гримас крысы, и считается самым простым для наблюдения и количественной оценки в данной модели мигрени у грызунов». В нашем исследовании группа NTG демонстрировала более высокие показатели, которые оставались относительно стабильными на протяжении пяти сеансов тестирования по сравнению с контрольной группой. Этот результат согласуется с данными, подтверждающими, что «введение глицерилтринитрата провоцирует начальную острую гипералгезию, за которой следует более типичный эпизод мигрени». Предполагается, что орбитальное сужение в этот период может быть поведенческим проявлением фоточувствительности при мигрени.

Группа BoNT/A демонстрировала более низкие показатели гримас по сравнению с группой NTG, хотя разница не достигла значимого уровня. В свою очередь, группа el-iBoNT показывала значительно более низкие значения на всех временных точках. Новый непаралитический токсин оказался более эффективным в снижении болевых проявлений, оцененных по шкале гримас крысы, по сравнению с нативным нейротоксином. Эти результаты свидетельствуют о высокой перспективности применения el-iBoNT для

лечения хронической мигрени.

3.3.2 Электронный тест вон Фрея

В дни инъекций раствора нитроглицерина (10 мг/кг) в/б у животных развилась механическая гиперчувствительность, измеряемая как снижение механического порога на задних лапах в соответствии с рисунком 3.10А. Экстракраниальные инъекции BoNT/A (5 Ед) и el-iBoNT (20 нг) за пять дней до начала индукции ХМ сохраняли механический порог на уровне сравнимым с нативными животными в соответствии с рисунками 3.10Б-3.10В.



Примечания

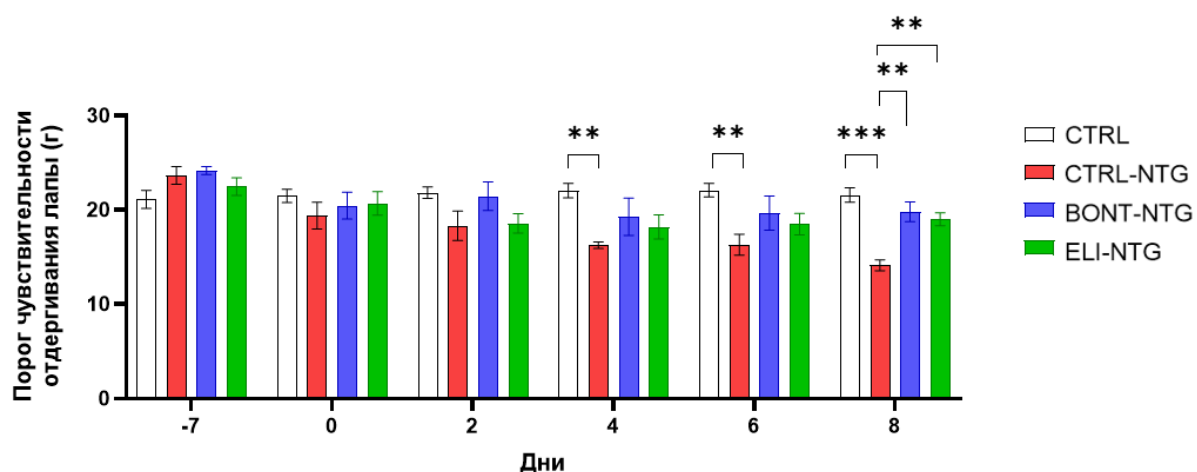
1 -7 – за 7 дней до индукции ХМ, 0, 2, 4, 6, 8 – дни индукции ХМ;
 2 CNRL (n=6) – группа физраствор+физраствор, CTRL-NTG (n=6; NTG, 10 мг/кг) – группа физраствор+NTG, BONT-NTG (n=6; NTG, 10 мг/кг) – группа BoNT/A+NTG, ELI-NTG (n=6; BoNT/A, 5 Ед + NTG, 10 мг/кг) – группа el-iBoNT+NTG (el-iBoNT, 20 нг + NTG, 10 мг/кг);
 3 Астериск указывает на внутригрупповые различия по сравнению с исходным уровнем.

Рисунок 3.10 – Развитие механической гиперчувствительности

Электронный фон Фрей доказал свою эффективность как чувствительный инструмент для оценки механической гиперчувствительности. Одним из главных его преимуществ является значительное сокращение времени эксперимента: для каждого животного достаточно провести до четырех измерений, тогда как ручной метод требует многократного применения отдельных нитей. Это не только уменьшает риск сенсibilизации лапы, но и снижает вероятность формирования условных поведенческих реакций при повторных тестированиях. Кроме того, электронный фон Фрей уже успешно использовался в исследованиях механической гиперчувствительности в моделях хронической мигрени [136, 151, 153, 155]. Результаты настоящего исследования согласуются с ранее опубликованными данными, что подтверждает высокую воспроизводимость и надежность метода.

3.3.3 Тест Харгривза

На четвертый, шестой и восьмой дни инъекций раствора нитроглицерина (10 мг/кг) в/б у животных развилась температурная гиперчувствительность, измеряемая как снижение латентного периода в ответ на нагревание медиальной поверхности задней лапы. Экстракраниальные инъекции BoNT/A (5 Ед) и el-iBoNT (20 нг) за пять дней до начала индукции ХМ сохраняли температурный порог на уровне сравнимым с нативными животными только на 8 день в соответствии с рисунком 3.11.



Примечания

- 1 -7 – за 7 дней до индукции ХМ, 0, 2, 4, 6, 8 – дни индукции ХМ;
- 2 CNRL (n=6) – группа физраствор+физраствор, CTRL-NTG (n=6; NTG, 10 мг/кг) – группа физраствор+NTG, BONT-NTG (n=6; NTG, 10 мг/кг) – группа BoNT/A+NTG, ELI-NTG (n=6; BoNT/A, 5 Ед + NTG, 10 мг/кг) – группа el-iBoNT+NTG (el-iBoNT, 20 нг + NTG, 10 мг/кг);
- 3 Астериск указывает на внутригрупповые различия по сравнению с исходным уровнем. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

Рисунок 3.11 – Развитие температурной гиперчувствительности

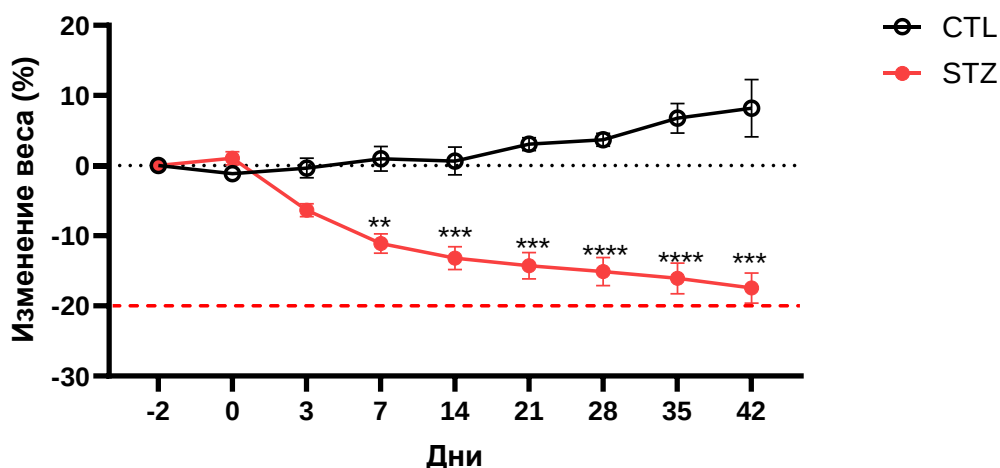
Таким образом, в условиях модели хронической мигрени в случае механической гиперчувствительности эффект сохранялся на протяжении всего периода наблюдений, тогда как в отношении температурной гиперчувствительности защитное действие отмечалось лишь на позднем этапе. Эти данные подтверждают эффективность el-iBoNT в снижении гиперчувствительности при хронической мигрени, демонстрируя их потенциал как профилактических средств. Однако различия в сроках и степени действия на механическую и температурную гиперчувствительность указывают на необходимость дальнейших исследований для понимания механизмов действия и длительности эффекта.

3.4 Результаты лечения болевой гиперчувствительности в модели болевой диабетической периферической нейропатии

Методы, использованные для индукции БДПН, оценки чувствительности, а также лечения, описаны в главах 2.4.2 «Стрептозотоцин-индуцированная модель диабетической нейропатии», 2.5 «Поведенческие тесты», 2.6 «Инъекции ботулинических препаратов».

3.4.1 Индукция гипергликемии

Чтобы вызвать гипергликемию, основным признаком диабета, мы вводили взрослым половозрелым самцам крыс одну дозу STZ (45 мг/кг, внутривенно). Средний уровень глюкозы в крови в группе STZ был выше 410 мг/дл (без голодания) в течение всего эксперимента в соответствии с рисунком 3.12 и таблицей 3.10. В группе STZ наблюдались другие проявления диабета, включая снижение массы тела в соответствии с рисунком 3.13 и таблицей 3.11, полидипсию, полиурию, полифагию (данные не приведены).



Примечания

- 1 -2 – за 7 дней до индукции СД, 0, 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42 – дни после инъекции STZ;
- 2 CTL (n=6) – группа физраствор, STZ (n=20; STZ, 45 мг/кг) – группа стрептозотоцина;
- 3 Астериск указывает на межгрупповые различия. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

Рисунок 3.12 – Изменение веса (%)

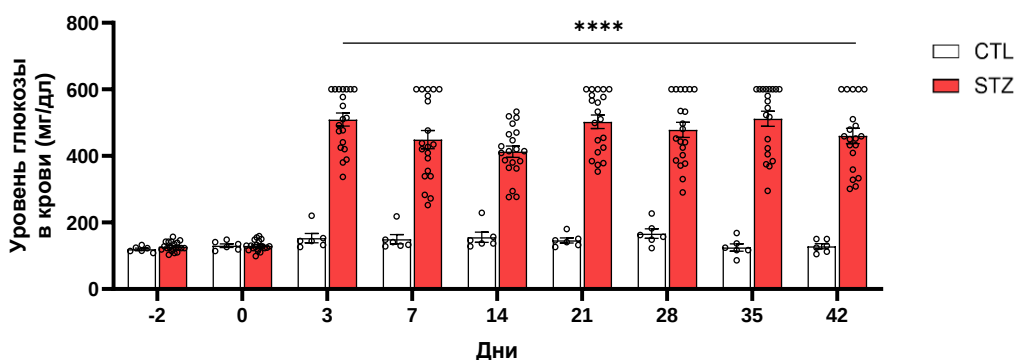
Таблица 3.10 – Средние показатели изменения веса крыс в течение всего эксперимента (%)

День	CTL			STZ		
	MEAN	SEM	N	MEAN	SEM	N
-2	0	0	6	0	0	20
0	-1,155	0,74201	6	1,0525	0,934297	20
3	-0,34	1,397658	6	-6,353	0,898532	20
7	0,985	1,743546	6	-11,0905	1,378305	20
14	0,661667	1,985614	6	-13,1925	1,635948	20
21	3,073333	0,910834	6	-14,258	1,867112	20
28	3,685	0,912289	6	-15,0975	2,007348	20
35	6,751667	2,090131	6	-16,0755	2,17461	20
42	8,203333	4,08303	6	-17,443	2,146059	20

Примечания

1 -2 – за 7 дней до индукции СД, 0, 3, 7, 14, 21, 28, 25,42 – дни после инъекции STZ;

2 CTL (n=6) – группа физраствор; STZ (n=20; STZ, 45 мг/кг) – группа стрептозотоцина.



Примечания

1 -2 – за 7 дней до индукции СД, 0, 3, 7, 14, 21, 28, 25,42 – дни после инъекции STZ\$;

2 CTL (n=6) – группа физраствор; STZ (n=20; STZ, 45 мг/кг) – группа стрептозотоцина;

3 Астериск указывает на межгрупповые различия. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Рисунок 3.13 – Изменение уровня глюкозы в крови (мг/дл)

Таблица 3.11 – Средние показатели уровня глюкозы в крови крыс в течение всего эксперимента (мг/дл)

День	CTL			STZ		
	MEAN	SEM	N	MEAN	SEM	N
-2	119,33333	3,5182066	6	127,25	3,137947	20
0	130,5	5,3587934	6	129,35	3,422276	20
3	153,16667	13,929385	6	509,3	19,67233	20
7	149,66667	14,001587	6	449,05	27,25402	20
14	155,66667	15,204531	6	412,8	16,97996	20

Продолжение таблицы 3.11

21	146	7,7502688	6	502,6	20,27526	20
28	166,5	14,42856	6	478,15	22,66254	20
35	124,83333	11,019427	6	511,45	22,73121	20
42	128,5	7,6843998	6	460,05	22,84012	20
Примечания						
1 -2 – за 7 дней до индукции СД, 0, 3, 7, 14, 21, 28, 25,42 – дни после инъекции STZ;						
2 CTL (n=6) – группа физраствор; STZ (n=20; STZ, 45 мг/кг) – группа стрептозотоцина.						

Значительное повышением уровня глюкозы в крови (диапазон 300–600 мг/дл) по сравнению с нормальными показателями (60–100 мг/дл) согласуется с ранее опубликованными данными [169, стр. 3]. Модель БДПН демонстрировала другие характерные поведенческие и физиологические изменения у животных, включая снижение физической активности, увеличение потребления воды (около 70 мл/день) и пищи (примерно 12 г на 100 г массы тела), учащенное мочеиспускание и эпизоды диареи. Подобные симптомы описаны в литературе, а исследования предполагают, что причиной являются нарушения моторной активности кишечника [181, 182].

Также важно отметить, что использование сравнительно низкой дозы STZ в нашем исследовании позволило не только вызвать гипергликемию, но и сохранить достаточный уровень активности животных для выполнения поведенческих тестов. Это критически важно при изучении боли, так как неподвижность животных может существенно повлиять на результаты тестирования. Ранее в литературе уже было показано, что сравнительно низкие дозы STZ имеют сниженную эффективность в индуцировании гипергликемии, а более высокие дозы повышают эту эффективность, однако сопровождаются повышенным риском развития тяжёлой интоксикации.

Таким образом, выбранный протокол инъекций STZ оказался адекватным для создания модели БДПН, характеризующейся воспроизводимыми поведенческими и физиологическими изменениями.

3.4.2 Поведенческие тесты в модели болевой диабетической периферической нейропатии

Механическую гипералгезию определяли с помощью электронного теста вон Фрея, температурную гипералгезию – теста Харгривза. 20 крыс с гипергликемией показали значительное снижение механического и температурного порога через 28 дней после индукции диабета, что свидетельствует о механической и температурной гипералгезии. Крысы, не развившие гипергликемию, или крысы с гипергликемией не испытывавшие гипералгезию были исключены из исследования.

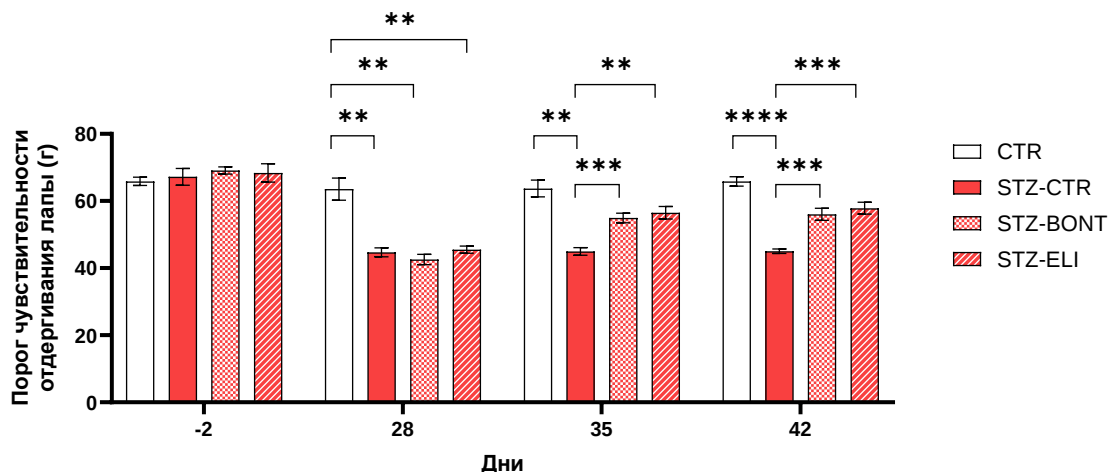
Животные с гипералгезией были включены в дальнейшие эксперименты как группы с нейропатической болью: STZ-CTL, STZ-BONT, STZ-ELI. Животных (n=26) разделили на 4 группы, в соответствии с вводимыми препаратами и рисунком 3.14.



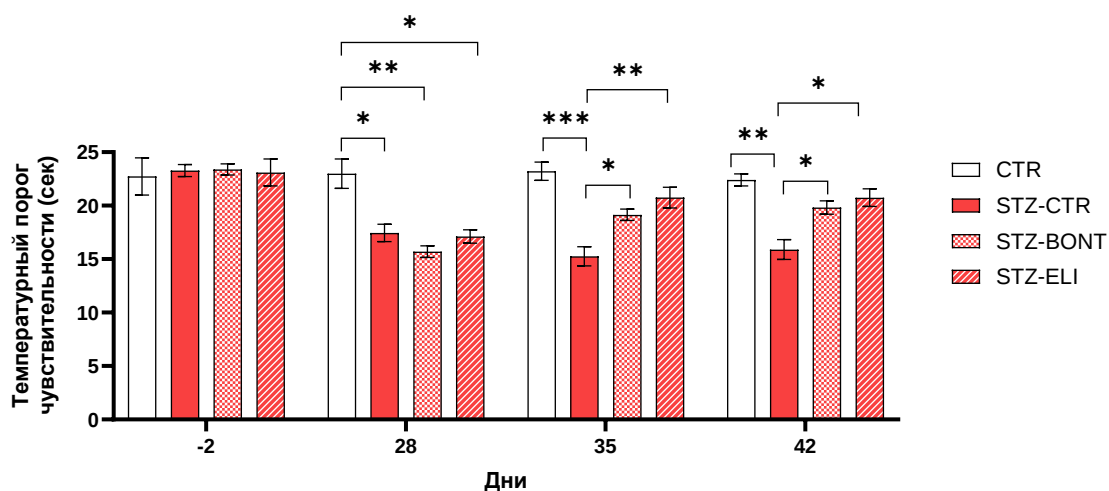
Рисунок 3.14 – Распределение крыс на группы в модели болевой диабетической периферической нейропатии

У этих животных однократная односторонняя инъекция BoNT/A (5 U) или el-iBoNT (20 нг) в подушечку задней лапы значительно снижала механическую и температурную гиперчувствительность в соответствии с рисунками 3.15А-3.15Б.

А)



Б)



Примечания

1 -2 – за 7 дней до индукции СД, 0, 3, 7, 14, 21, 28, 25,42 – дни после инъекции STZ;
 2 CTRL (n=6) – группа физраствор+физраствор, STZ-CTL (n=6; STZ, 45 мг/кг) – STZ+ физраствор, STZ-BONT (n=7; STZ, 45 мг/кг) – группа BoNT/A+NTG, STZ-ELI (n=7; STZ, 45

мг/кг + BoNT/A, 5 Ед) – группа el-iBoNT+NTG (STZ, 45 мг/кг + el-iBoNT, 20 нг);
3 Астериск указывает на внутригрупповые различия по сравнению с исходным уровнем.
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Рисунок 3.15 – Изменение в гиперчувствительности. (А) Механическая гиперчувствительность; (Б) Температурная гиперчувствительность

Результаты проведенных поведенческих тестов подтвердили развитие механической и температурной гипералгезии у крыс с индуцированной болевой диабетической периферической нейропатией. Это соответствует известным данным о том, что гипергликемия, вызванная введением STZ, приводит к повреждению периферических нервов, что, в свою очередь, вызывает гипералгезию. Отбор животных, не испытывавших гипералгезию, из дальнейших экспериментов позволил исключить вариативность, связанную с индивидуальной устойчивостью к развитию нейропатической боли.

Наши результаты показывают, что обе формы препарата достоверно уменьшали как механическую, так и температурную гиперчувствительность у животных с БДПН. Это согласуется с исследованиями, демонстрирующими анальгетический эффект ботулинического токсина за счет его способности снижать периферическую сенсibilизацию, модулировать высвобождение нейротрансмиттеров и подавлять воспалительные процессы.

Таким образом, результаты данного исследования подтверждают, что использование производных ботулинического нейротоксина может быть эффективным подходом для контроля болевого синдрома. Однако для полноценной клинической интерпретации полученных данных необходимы дальнейшие исследования, направленные на изучение механизма действия el-iBoNT, длительности его эффекта и безопасности при повторных введениях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лечение хронической боли при таких состояниях как хроническая мигрень и болевая диабетическая нейропатия остается одной из нерешенных медицинских проблем, приносящих как экономические, так и социальные потери. В настоящее время нативные BoNT/A с высокими паралитическими свойствами применяются при хронических болевых состояниях, однако степень обезболивания, достигаемая при использовании допустимых доз парализующего нативного BoNT/A, часто оказывается недостаточной для удовлетворения как врачей, так и пациентов. Вводить большие дозы для усиления наблюдаемого анальгетического эффекта невозможно из-за паралитических свойств BoNT/A. Поэтому разработанный препарат BoNT, el-iBoNT, который обладает пониженными паралитическими свойствами, но по-прежнему способный анальгетически воздействовать на сенсорные нейроны, является перспективным вариантом решения представленной проблемы.

Новые результаты, представленные здесь, можно разделить на несколько основных выводов. Во-первых, было продемонстрировано, что благодаря новому подходу к конъюгации белков SpyCatcher–SpyTag можно создавать функциональный ботулинический нейротоксин. Этот метод представляет собой безопасный подход к производству молекул ботулина для терапевтического использования. Во-вторых, было показано, что молекула el-iBoNT демонстрирует значительно меньшую паралитическую активность при сравнении с нативным токсином, что подчеркивает важность структуры в действии молекул, полученных из BoNT/A. В-третьих, el-iBoNT эффективно облегчает боль, вызванную систематическим введением нитроглицерина в NTG-индуцированной модели хронической мигрени. В-четвертых, показана эффективность терапии боли el-iBoNT в STZ-индуцированной модели болевой диабетической нейропатии. В совокупности наше исследование показывает, что сконструированная молекула el-iBoNT может стать новым терапевтическим средством для людей, страдающих хронической мигренью и болевой диабетической нейропатией. Это очень важно, учитывая, что в настоящее время существует очень ограниченное количество терапевтических средств для лечения хронической боли, которые часто неэффективны, вызывают непереносимые побочные эффекты и подпитывают опиоидный кризис.

Мы оценили новую молекулу на основе ботулинического нейротоксина, el-iBoNT, в двух моделях хронической боли. На поведенческом уровне однократная инъекция данного препарата уменьшала спровоцированную гиперчувствительность на механические и температурные раздражители у sensibilized животных в установленной поведенческой модели, имеющей отношение к мигренозной боли или диабетической нейропатии. Таким образом, препарат el-iBoNT, подавляющий ноцицептивное поведение при отсутствии мышечного паралитического эффекта, представляет собой перспективное средство для лечения хронических болевых состояний.

СПИСОК ПРИВЕДЕННЫХ РИСУНКОВ

- 1 Рисунок 1.1 – Структура ботулинического нейротоксина типа А. (А) Трехмерная структура BoNT/A; (Б) Схематичное изображение структуры BoNT/A.
- 2 Рисунок 1.2 – Схематическое изображение механизма действия ботулинических нейротоксинов. (А) Модель проникновения BoNT в терминаль; (Б) Дифференцированное действие BoNT на SNARE белки.
- 3 Рисунок 1.3 – Действие BoNT/A на пути распространения боли.
- 4 Рисунок 1.4 – Сравнение конструкций ботулинического нейротоксина. (А) BiTox/A (спираль SNARE: светло-голубой); (Б) Bitox/AA; (В) Tetbot (рецептор-связывающий домен столбчатого токсина: серый); (Г) SP-Bot (субстанция Р: бирюзовый); (Д) Derm-Bot (пептид дерморфина: красный); (Ж) iBoNT (Spycatcher-Spytag: зеленый); (З) непаралитический удлинённый iBoNT (синтаксин-производная удлиняющая последовательность: светло-голубой).
- 5 Рисунок 1.5 – Схематичное изображение основных структур/процессов в патофизиологии мигрени.
- 6 Рисунок 2.1 – Таймлайн проведения поведенческих тестов. (А) Модель ХМ; (Б) Модель БДПН.
- 7 Рисунок 2.2 – Схема теста вон Фрея.
- 8 Рисунок 2.3 – Схема теста Харгривза.
- 9 Рисунок 2.4 – Сравнение гримас крысы без/с болью.
- 10 Рисунок 3.1 – Очищенные белки и спонтанная сборка el-iBoNT в SDS-PAGE.
- 11 Рисунок 3.2 – Изменение пространственных параметров el-iBoNT. (А) Структура нативного ботулинического нейротоксина типа А; (Б) Структура el-iBoNT.
- 12 Рисунок 3.3 – Изображение крыс 72 часа спустя после инъекции. (А) BoNT/A (20 Ед); (Б-Г) el-iBoNT (50 нг, 100 нг, 150 нг) в правую икроножную мышцу; (Д) Гистограмма, показывающая количество крыс, на которых заметно повлияли инъекции (n = 3).
- 13 Рисунок 3.4 – Разделение крыс на группы в модели хронической мигрени.
- 14 Рисунок 3.5 – Репрезентативное изображение гримас крыс.
- 15 Рисунок 3.6 – Внутригрупповое сравнение общего балла по ШГК.
- 16 Рисунок 3.7 – Внутригрупповое сравнение орбитального сужения.
- 17 Рисунок 3.8 – Межгрупповое сравнение общего балла по ШГК.
- 18 Рисунок 3.9 – Межгрупповое сравнение орбитального сужения.
- 19 Рисунок 3.10 – Развитие механической гиперчувствительности.
- 20 Рисунок 3.11 – Развитие температурной гиперчувствительности.
- 21 Рисунок 3.12 – Изменение веса (%).
- 22 Рисунок 3.13 – Изменение уровня глюкозы в крови (мг/дл).
- 23 Рисунок 3.14 – Распределение крыс на группы в модели болевой диабетической периферической нейропатии.
- 24 Рисунок 3.15 – Изменение в гиперчувствительности. (А) Механическая

гиперчувствительность; (Б) Температурная гиперчувствительность.

25 Рисунок А1 – Заключение ЛЭК №IRB-377 от 24.02.2022.

26 Рисунок А2 – Дополнение ЛЭК №IRB-A377 от 18.11.2022.

27 Рисунок А3 – Заключение ЛЭК №IRB-377 от 09.01.2025.

28 Рисунок Б1 – Постер ШГК от Национального центра по замене, совершенствованию и сокращению использования животных в исследованиях.

СПИСОК ПРИВЕДЕННЫХ ТАБЛИЦ

- 1 Таблица 1.1 – Результаты использования BoNT/A при хронических болевых состояниях.
- 2 Таблица 1.2 – Критерии мигрени без ауры и мигрени с аурой.
- 3 Таблица 1.3 – Обзор фармацевтических препаратов, доступных для профилактики хронической мигрени.
- 4 Таблица 1.4 – Обобщение результатов в ответ на системное введение NTG у грызунов.
- 5 Таблица 1.5 – Препараты для лечения пациентов с БДПН.
- 6 Таблица 1.6 – Обобщение результатов в ответ на STZ у грызунов.
- 7 Таблица 2.1 – Оборудование, реагенты и материалы, необходимые для индукции мигрени.
- 8 Таблица 2.2 – Оборудование, реагенты и материалы, необходимые для индукции гипергликемии.
- 9 Таблица 2.3 – Оборудование и материалы, необходимые для проведения теста вон Фрея.
- 10 Таблица 2.4 – Оборудование и материалы, необходимые для проведения теста Харгривза.
- 11 Таблица 3.1 – Изображения, использованные для оценки по ШГК в модели экспериментальной ХМ. Группа CTRL.
- 12 Таблица 3.2 – Изображения, использованные для оценки по ШГК в модели экспериментальной ХМ. Группа CTRL-NTG.
- 13 Таблица 3.3 – Изображения, использованные для оценки по ШГК в модели экспериментальной ХМ. Группа BONT-NTG.
- 14 Таблица 3.4 – Изображения, использованные для оценки по ШГК в модели экспериментальной ХМ. Группа ELI-NTG.
- 15 Таблица 3.5 – Внутрикласовый коэффициент корреляции (α Кронбаха).
- 16 Таблица 3.6 – Внутригрупповые сравнения (с исходным уровнем) показателей ШГК во всех временных точках.
- 17 Таблица 3.7 – Внутригрупповые сравнения (с исходным уровнем) показателей орбитального сужения во всех временных точках.
- 18 Таблица 3.8 – Межгрупповое сравнение показателей ШГК во всех временных точках.
- 19 Таблица 3.9 – Межгрупповое сравнение показателей по орбитальному сужению во всех временных точках.
- 20 Таблица 3.10 – Средние показатели изменения веса крыс в течение всего эксперимента (%).
- 21 Таблица 3.11 – Средние показатели уровня глюкозы в крови крыс в течение всего эксперимента (мг/дл).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Reckziegel D., Vachon-Preseu E., Petre B., Schnitzer T.J., Baliki M.N., Apkarian A.V. Deconstructing biomarkers for chronic pain: context-and hypothesis-dependent biomarker types in relation to chronic pain //Pain. – 2019. – Т. 160. – P.S37-S48. doi:10.1097/j.pain.0000000000001529
- 2 Cohen S.P., Vase L. Hooten W.M. Chronic pain: an update on burden, best practices, and new advances //The Lancet. – 2021. – Т. 397(10289). – P.2082-2097. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00393-7
- 3 Attal N. Pharmacological treatments of neuropathic pain: The latest recommendations //Revue neurologique. – 2019. – Т. 175(1-2). – P.46-50. doi: 10.1016/j.neurol.2018.08.005
- 4 Chou R., Turner J.A., Devine E.B., Hansen R.N., Sullivan S.D., Blazina I., Dana T., Bougatsos C., Deyo R.A. The effectiveness and risks of long-term opioid therapy for chronic pain: a systematic review for a National Institutes of Health Pathways to Prevention Workshop //Annals of internal medicine. – 2015. – Т. 162(4). – P.276-286. doi: 10.7326/M14-2559
- 5 Zhantleuova A., Leese C., Andreou A.P., Karimova A., Carpenter G., Davletov B. Recent Developments in Engineering Non-Paralytic Botulinum Molecules for Therapeutic Applications //Toxins. – 2024. – Т. 16(4). – P. 175. doi: 10.3390/toxins16040175
- 6 Ihara K., Casillo F., Dahshan A., Genç H., Jusupova A., Karbozova K., Lee W., Liaw Y.C., Mavridis T., Park H.K., Polat B., Unt T.H., Vashchenko N., Zhantleuova A., Pozo-Rosich P., Schwedt T. J. Are we closer to achieving precision medicine for migraine treatment? A narrative review //Cephalalgia. – 2024. – Т. 44(9). – P. 03331024241281518. doi: 10.1177/03331024241281518
- 7 Zhantleuova A. K., Karimova A. S., Davletov B. A. Examples of Clinical Use of Botulinum Toxin: A Literature Review //BULLETIN of the LN Gumilyov Eurasian National University. BIOSCIENCE Series. – 2024. – Т. 143(2). – P. 81-90.
- 8 Zhantleuova A. K., Karimova A. S., Davletov B. A. Study of a painful diabetic peripheral neuropathy model induced by streptozotocin: conclusions before investigating non-paralytic botulinum molecules //Bulletin of the Karaganda University “Biology medicine geography Series”. – 2024. – Т. 11429(2). – P. 127-132.
- 9 Zhantleuova A. K., Karimova A. S., Davletov B. A. Use of rat grimace scale in pain research //Experimental Biology. – 2024. – Т. 98(1). – P. 154-166. doi: 10.26577/eb.2024.v98.i1.013
- 10 Zhantleuova A., Karimova A., Davletov B. Non-Paralytic Botulinum Toxin A in Migraine //Toxicon. Toxins 2024 7th International Conference. – Berlin, Germany. – 2024. – P. 93-94. doi: 10.1016/j.toxicon.2024.107513
- 11 Zhantleuova A. K. The effects of botulinum toxin on pain thresholds in nitroglycerininduced migraine model in rats //Materials International Scientific Conference of Students and Young Scientists «FARABI ALEMI». – Almaty, Kazakhstan. – 2023. – P. 239-240.
- 12 Жантлеуова А. К. Разработка нейроблокаторов боли длительного

действия //Материалы международной научной конференции студентов и молодых ученых «ФАРАБИ ЭЛЕМІ». – Алматы, Казахстан. – 2022. – С. 154.

13 Жантлеуова А. К. Оценка боли в моделях хронической боли: тесты вон Фрея и Харгривза //Материалы II международной научно-практической конференции «Интеграция наук: биофизика, биомедицина, нейронаука и биология». – Алматы, Казахстан. – 2023. – С. 140.

14 Zhantleuova A. K. Development of long-acting pain neuroblockers // Материалы I международной научно-практической конференции «Интеграция наук: биофизика, биомедицина, нейронаука и биология». – Алматы, Казахстан. – 2022. – С. 148–149.

15 Popoff M.R., Bouvet P. Genetic characteristics of toxigenic Clostridia and toxin gene evolution //Toxicon. – 2013. – Т. 75. – P. 63-89. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.05.003

16 Schiavo G., Poulain B., Benfenati F., DasGupta B.R. Montecucco C. Novel targets and catalytic activities of bacterial protein toxins //Trends in microbiology. – 1993. – Т. 1(5). – P. 170-174. doi: 10.1016/0966-842x(93)90086-7

17 Sutton R.B., Fasshauer D., Jahn R., Brunger A.T. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution //Nature. – 1998. – Т. 395(6700). – P. 347-353. doi: 10.1038/26412

18 Südhof T.C., Rothman J.E. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins //Science. – 2009. – Т. 323(5913). – P. 474-477. doi: 10.1126/science.1161748

19 Montal M. Botulinum neurotoxin: a marvel of protein design //Annu Rev Biochem. – 2010. – Т. 79. – P. 591-617. doi: 10.1146/annurev.biochem.051908

20 Lacy D.B., Tepp W., Cohen A.C., DasGupta B.R., Stevens R.C. Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity //Nat Struct Biol. – 1998. – Т. 5(10). – P. 898-902. doi: 10.1038/2338

21 Montecucco C., Schiavo G. Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins //Molecular microbiology. – 1994. – Т. 13(1). – P.1-8. doi: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00396.x

22 Puhar A., Johnson E.A., Rossetto O., Montecucco C. Comparison of the pH-induced conformational change of different clostridial neurotoxins //Biochemical and biophysical research communications. – 2004. – Т. 319(1). – P.66-71. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.04.140

23 Koriazova L.K., Montal M. Translocation of botulinum neurotoxin light chain protease through the heavy chain channel //Nature structural biology. – 2003. – Т. 10(1). – P.13-18. doi: 10.1038/nsb879

24 Mahrhold S., Rummel A., Bigalke H., Davletov B., Binz T. The synaptic vesicle protein 2C mediates the uptake of botulinum neurotoxin A into phrenic nerves //FEBS letters. – 2006. – Т. 580(8). – P.2011-2014. doi: 10.1016/j.febslet.2006.02.074

25 Davletov B., Bajohrs M., Binz T. Beyond BOTOX: advantages and limitations of individual botulinum neurotoxins //Trends in neurosciences. – 2005. – Т. 28(8). – P. 446-452. doi: 10.1016/j.tins.2005.06.001

26 Gill D.M. Bacterial toxins: a table of lethal amounts //Microbiological reviews. – 1982. – Т. 46(1). – P.86-94. doi: 10.1128/mr.46.1.86-94.1982

- 27 Erbguth F.J. Historical note on the therapeutic use of botulinum toxin in neurological disorders //Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry. – 1996. – T. 60(2). – P.151. doi: 10.1136/jnnp.60.2.151
- 28 Burgen A.S.V., Dickens F. Zatman L.J. The action of botulinum toxin on the neuro-muscular junction //The Journal of physiology. – 1949. – T. 109 (1-2). – P.10. doi: 10.1113/jphysiol.1949.sp004364
- 29 Scott A.B., Rosenbaum A., Collings C.C. Pharmacologic weakening of extraocular muscles //Investigative Ophthalmology & Visual Science. – 1973.– T. 12. – P. 924-927.
- 30 Scott A.B. Botulinum toxin injection into extraocular muscles as an alternative to strabismus surgery //Ophthalmology. – 1980. – T. 87. – P.1044-1049. doi: 10.3928/0191-3913-19800101-06
- 31 Hancox J., Sharma S., MacKenzie K., Adams G. The effect on quality of life of long-term botulinum toxin A injections to maintain ocular alignment in adult patients with strabismus //British journal of ophthalmolog. – 2012. – T. 96(6). – P. 838-840. doi: 10.1136/bjophthalmol-2011-301332
- 32 Scott A.B, Kennedy R.A., Stubbs H.A. Botulinum A toxin injection as a treatment for blepharospasm //Archives of ophthalmology. – 1985. – T. 103. – P. 347-350. doi:10.1001/archoph.1985.01050030043017
- 33 Drummond G.T., Hinz B.J. Botulinum toxin for blepharospasm and hemifacial spasm: stability of duration of effect and dosage over time //Canadian journal of ophthalmology. – 2001. – T. 36(7). – P. 398-403. doi: 10.1016/S0008-4182(01)80084-3
- 34 Jankovic J., Schwartz K., Donovan D.T. Botulinum toxin treatment of cranial-cervical dystonia, spasmodic dysphonia, other focal dystonias and hemifacial spasm //Journal of Neurology, Neurosurgery& Psychiatry. – 1990. – T. 53. – P. 633-639. doi: 10.1136/jnnp.53.8.633
- 35 Costa J., Espírito-Santo C.C., Borges A.A., Ferreira J., Coelho M.M., Moore P., Sampaio C. Botulinum toxin type A therapy for hemifacial spasm //Cochrane database of systematic reviews. – 2005. – T. 1. doi: 10.1002/14651858.CD004899.pub2
- 36 Jankovic J., Orman J. Botulinum A toxin for cranial-cervical dystonia: a double-blind, placebo-controlled study //Neurology. – 1987. – T. 37(4). – P.616-616. doi: 10.1212/WNL.37.4.616
- 37 Comella C.L., Jankovic J., Shannon K.M., Tsui J., Swenson M., Leurgans S., Fan W. Comparison of botulinum toxin serotypes A and B for the treatment of cervical dystonia //Neurology. – 2005. – T. 65(9). – P.1423-1429. doi: 10.1212/01.wnl.0000183055.81056.5c
- 38 Никифоров В.В. Ботулинический нейротоксин – и яд, и лекарство: ботулинотерапия и ятрогенный ботулизм //Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2022. – Т. 27(6). – P.341-359. doi: 10.17816/EID192525
- 39 Chen S. Clinical uses of botulinum neurotoxins: current indications, limitations and future developments //Toxins. – 2012. – T. 4(10). – P.913-939. doi: 10.3390/toxins4100913
- 40 Schlessinger J., Gilbert E., Cohen J.L., Kaufman J. New uses of

abobotulinumtoxinA in aesthetics //Aesthetic surgery journal. – 2017. – T. 37(suppl_1). – P. S45-S58. doi: 10.1093/asj/sjx005

41 Bushara K.O., Park D.M. Botulinum toxin and sweating //J Neurol Neurosurg Psychiatry. – 1994. – T. 57(11). – P.1437-1438. doi: 10.1136/jnnp.57.11.1437

42 Hosp C., Naumann M.K., Hamm H. Botulinum toxin treatment of autonomic disorders: focal hyperhidrosis and sialorrhea //In Seminars in neurology. – 2016. – T. 36. – P. 020-028. doi: 10.1055/s-0035-1571214

43 Jost W.H., Bäumer T., Laskawi R., Slawek J., Spittau B., Steffen A., Winterholler M., Bavikatte G. Therapy of sialorrhea with botulinum neurotoxin //Neurology and therapy. – 2019. – T. 8. – P.273-288. doi: 10.1007/s40120-019-00155-6

44 Lundy C.T., Doherty G.M., Fairhurst C.B. Botulinum toxin type A injections can be an effective treatment for pain in children with hip spasms and cerebral palsy //Developmental Medicine & Child Neurology. – 2009. – T. 51(9). – P.705-710. doi: 10.1111/j.1469-8749.2009.03315.x

45 Freund B., Schwartz M. Temporal relationship of muscle weakness and pain reduction in subjects treated with botulinum toxin A //The Journal of Pain. – 2003. – T. 4(3). – P.159-165. doi: 10.1054/jpai.2003.435

46 Relja M., Klepac N. Different doses of botulinum toxin A and pain responsiveness in cervical dystonia //Neurology. – 2002. – T. 58(7). – P.474-474.

47 Dodick D.W., Turkel C.C., DeGryse R.E., Aurora S.K., Silberstein S.D., Lipton R.B., Diener H.C., Brin M.F. OnabotulinumtoxinA for treatment of chronic migraine: Pooled results from the double-blind, randomized, placebo-controlled phases of the PREEMPT clinical program //Headache: The Journal of Head and Face Pain. – 2010. – T. 50(6). – P.921-936.

48 Lanteri-Minet M., Ducros A., Francois C., Olewinska E., Nikodem M., Dupont-Benjamin L. Effectiveness of onabotulinumtoxinA (BOTOX®) for the preventive treatment of chronic migraine: A meta-analysis on 10 years of real-world data //Cephalalgia. – 2022. – T. 42(14). – P.1543-1564. doi: 10.1177/03331024221123058

49 Dhanasekara C.S., Payberah D., Chyu J.Y., Shen C.L., Kahathuduwa C.N. The effectiveness of botulinum toxin for chronic tension-type headache prophylaxis: A systematic review and meta-analysis //Cephalalgia. – 2023. – T. 43(3) – P.03331024221150231. doi: 10.1177/03331024221123058

50 Morra M.E., Elgebaly A., Elmaraezy A., Khalil A.M., Altibi A.M., Vu T.L.H., Mostafa M.R., Huy N.T., Hirayama K. Therapeutic efficacy and safety of Botulinum Toxin A Therapy in Trigeminal Neuralgia: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials //The journal of headache and pain. – 2016. – T. 17. – P. 1-9. doi: 10.1186/s10194-016-0651-8

51 Lakhan S.E., Velasco D.N., Tepper D. Botulinum toxin-A for painful diabetic neuropathy: a meta-analysis //Pain Medicine. – 2015. – T. 16(9). – P. 1773-1780. doi: 10.1111/pme.12728

52 Hary V., Schitter S., Martinez V. Efficacy and safety of botulinum A toxin for the treatment of chronic peripheral neuropathic pain: a systematic review of randomized controlled trials and meta-analysis //European Journal of Pain. – 2022. –

T. 26(5). – P. 980-990. doi: 10.1111/pme.12728

53 Mei L., Fengqun M., Zhengyao Z., Mingming F., Qing W., Xiaozhuo L., Dongpo S., Qian H., Tong C. Efficacy and safety of different drug treatments in patients with spinal-cord injury-related neuropathic pain: a network meta-analysis //Spinal Cord. – 2022. – T. 60(11). – P. 943-953. doi: 10.1038/s41393-022-00804-y

54 Khalifeh M., Mehta K., Varguise N., Suarez-Durall P., Enciso R. Botulinum toxin type A for the treatment of head and neck chronic myofascial pain syndrome: A systematic review and meta-analysis //The Journal of the American Dental Association. – 2016. – T. 147(12). – P. 959-973. doi: 10.1016/j.adaj.2016.08.022

55 Singh J.A., Fitzgerald P.M. Botulinum toxin for shoulder pain //Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2010. – T. 9. doi: 10.1002/14651858.CD008271.pub2

56 Kalichman L., Bannuru R.R., Severin M., Harvey W. Injection of botulinum toxin for treatment of chronic lateral epicondylitis: systematic review and meta-analysis //In Seminars in arthritis and rheumatism. – 2011. – T. 40(6). – P. 532-538. doi: 10.1016/j.semarthrit.2010.07.002

57 Li T.T., Liu Z.Y., Xiong L., Zhang Z.W. Clinical efficacy of botulinum toxin type A in the treatment of fasciitis pain: A systematic review and meta-analysis //Medicine. – 2023. – T. 102(30). – P.e34461. doi: 10.1097/MD.00000000000034461

58 Panunzio A., Tafuri A., Mazzucato G., Cerrato C., Orlando R., Pagliarulo V., Antonelli A., Cerruto M.A. Botulinum toxin-a injection in chronic pelvic pain syndrome treatment: a systematic review and pooled meta-analysis //Toxins. – 2022. – T. 14(1). – P.25. doi: 10.3390/toxins14010025

59 Li S., Peng S., Chen F., Zeng B., Zhang Z., Zhang Z. The application and therapeutic effect of botulinum toxin type a (BTX-A) in the treatment of patients with pain after cancer treatment: a systematic review and meta-analysis //International Journal of Surgery. – 2024. – T. 110(2). – P. 1215-1223. doi: 10.1097/JS9.0000000000000916

60 Matak I., Bölcskei K., Bach-Rojecky L., Helyes Z. Mechanisms of botulinum toxin type A action on pain //Toxins. – 2019. – T. 11(8). – P.459. doi: 10.3390/toxins11080459

61 Durham P.L., Cady R., Cady R. Research Submissions Regulation of Calcitonin Gene-Related Peptide Secretion From Trigeminal Nerve Cells by Botulinum Toxin Type A: Implications for Migraine Therapy //Headache: The Journal of Head & Face Pain. – 2004. – T. 44(1). doi: 10.1111/j.1526-4610.2004.04007.x

62 Purkiss J., Welch M., Doward S., Foster K. Capsaicin-stimulated release of substance P from cultured dorsal root ganglion neurons: involvement of two distinct mechanisms //Biochemical pharmacology. – 2000. – T. 59(11). – P.1403-1406. doi: 10.1016/S0006-2952(00)00260-4

63 Rapp D.E., Turk K.W., Bales G.T., Cook S.P. Botulinum toxin type a inhibits calcitonin gene-related peptide release from isolated rat bladder //The Journal of urology. – 2006. – T. 175(3) – P. 1138-1142. doi: 10.1016/S0022-5347(05)00322-8

64 Cui M., Khanijou S., Rubino J., Aoki K.R. Subcutaneous administration of botulinum toxin A reduces formalin-induced pain //Pain. – 2004. – T. 107(1-2) – P. 125-133. doi: 10.1016/j.pain.2003.10.008

- 65 Lora V.R.M.M., Clemente-Napimoga J.T., Abdalla H.B., Macedo C.G., de la Torre Canales G., Barbosa C.M.R. Botulinum toxin type A reduces inflammatory hypernociception induced by arthritis in the temporomandibular joint of rats //Toxicon. – 2017. – T. 129. – P. 52-57. doi: 10.1016/j.toxicon.2017.02.010
- 66 Shao Y.F., Zhang Y., Zhao P., Yan W.J., Kong X.P., Fan L.L., Hou Y.P. Botulinum toxin type A therapy in migraine: Preclinical and clinical trials //Iranian Red Crescent Medical Journal. – 2013. – T. 15(10). doi: 10.5812/ircmj.7704
- 67 Silva L.B.D., Karshenas A., Bach F.W., Rasmussen S., Arendt-Nielsen L., Gazerani P. Blockade of glutamate release by botulinum neurotoxin type A in humans: a dermal microdialysis study //Pain Research and Management. – 2014. – T. 19(3). – P.126-132. doi: 10.1155/2014/410415
- 68 Cernuda-Morollón E., Ramón C., Martínez-Camblor P., Serrano-Pertierra E., Larrosa D., Pascual J. OnabotulinumtoxinA decreases interictal CGRP plasma levels in patients with chronic migraine //Pain. – 2015. – T. 156(5). – P. 820-824. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000119
- 69 Morenilla-Palao C., Planells-Cases R., García-Sanz N., Ferrer-Montiel A. Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity //Journal of Biological Chemistry. – 2004. – T. 279(24). – P.25665-25672. doi: 10.1074/jbc.M311515200
- 70 Shimizu T., Shibata M., Toriumi H., Iwashita T., Funakubo M., Sato H., Kuroi T., Ebine T., Koizumi K., Suzuki N. Reduction of TRPV1 expression in the trigeminal system by botulinum neurotoxin type-A //Neurobiology of disease. – 2012. – T. 48(3). – P. 367-378. doi: 10.1016/j.nbd.2012.07.010
- 71 Shin M.C., Wakita M., Xie D.J., Yamaga T., Iwata S., Torii Y., Harakawa T., Ginnaga A., Kozaki S., Akaike N. Inhibition of membrane Na⁺ channels by A type botulinum toxin at femtomolar concentrations in central and peripheral neurons //Journal of pharmacological sciences. – 2012. – T. 118(1). – P.33-42. doi: 10.1254/jphs.11060FP
- 72 Burstein R., Zhang X., Levy D., Aoki K.R., Brin M.F. Selective inhibition of meningeal nociceptors by botulinum neurotoxin type A: therapeutic implications for migraine and other pains //Cephalalgia. – 2014. – T. 34(11). – P.853-869. doi: 10.1177/0333102414527648
- 73 Paterson K., Lolignier S., Wood J.N., McMahon S.B., Bennett D.L. Botulinum toxin-A treatment reduces human mechanical pain sensitivity and mechanotransduction //Annals of neurology. – 2014. – T. 75(4). – P. 591-596. doi: 10.1002/ana.24122
- 74 Yiangou Y., Facer P., Ford A., Brady C., Wiseman O., Fowler C.J., Anand P. Capsaicin receptor VR1 and ATP-gated ion channel P2X3 in human urinary bladder //BJU international. – 2001. – T. 87(9). – P. 774-779. doi: 10.1046/j.1464-410x.2001.02190.x
- 75 Apostolidis A., Popat R., Yiangou Y., Cockayne D., Ford A.P.D.W., Davis J.B., Dasgupta P., Fowler C.J., Anand P. Decreased sensory receptors P2X3 and TRPV1 in suburothelial nerve fibers following intradetrusor injections of botulinum toxin for human detrusor overactivity //The Journal of urology. – 2005. – T. 174(3). – P. 977-983. doi: 10.1097/01.ju.0000169481.42259.54

- 76 Luvisetto S., Vacca V., Cianchetti C. Analgesic effects of botulinum neurotoxin type A in a model of allyl isothiocyanate-and capsaicin-induced pain in mice //Toxicon. – 2015. – T. 94. – P. 23-28. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.12.007
- 77 Zhang X., Strassman A.M., Novack V., Brin M.F., Burstein R. Extracranial injections of botulinum neurotoxin type A inhibit intracranial meningeal nociceptors' responses to stimulation of TRPV1 and TRPA1 channels: Are we getting closer to solving this puzzle? //Cephalalgia. – 2016. – T. 36(9). – P.875-886. doi: 10.1177/0333102416636843
- 78 Bach-Rojecky L., Lacković Z. Central origin of the antinociceptive action of botulinum toxin type A //Pharmacology Biochemistry and Behavior. – 2009. – T. 94(2). – P. 234-238. doi: 10.1016/j.pbb.2009.08.012
- 79 Lacković Z., Filipović B., Matak I., Helyes Z. Activity of botulinum toxin type A in cranial dura: implications for treatment of migraine and other headaches //British journal of pharmacology. – 2016. – T. 173(2). – P. 279-291. doi: 10.1111/bph.13366
- 80 Favre-Guilmard C., Auguet M., Chabrier P.E. Different antinociceptive effects of botulinum toxin type A in inflammatory and peripheral polyneuropathic rat models //European journal of pharmacology. – 2009. – T. 617(1-3). – P.48-53. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.06.047
- 81 Bach-Rojecky L., Šalković-Petrišić M., Lacković Z. Botulinum toxin type A reduces pain supersensitivity in experimental diabetic neuropathy: bilateral effect after unilateral injection //European journal of pharmacology. – 2010. – T. 633(1-3). – P.10-14. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.01.020
- 82 Matak I., Bach-Rojecky L., Filipović B., Lacković Z. Behavioral and immunohistochemical evidence for central antinociceptive activity of botulinum toxin A //Neuroscience. – 2011. – T. 186. – P.201-207. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.04.026
- 83 Drinovac Vlah V., Bach-Rojecky L., Lacković Z. Antinociceptive action of botulinum toxin type A in carrageenan-induced mirror pain //Journal of neural transmission. – 2016. – T. 123. – P.1403-1413. doi: 10.1007/s00702-016-1605-7
- 84 Drinovac V., Bach-Rojecky L., Matak I., Lacković Z. Involvement of μ -opioid receptors in antinociceptive action of botulinum toxin type A //Neuropharmacology. – 2013. – T. 70. – P.331-337.
- 85 Drinovac V., Bach-Rojecky L., Lacković Z. Association of antinociceptive action of botulinum toxin type A with GABA-A receptor //Journal of neural transmission. – 2014. – T. 121. – P. 665-669. doi: 10.1007/s00702-013-1150-6
- 86 Vacca V., Marinelli S., Luvisetto S., Pavone F. Botulinum toxin A increases analgesic effects of morphine, counters development of morphine tolerance and modulates glia activation and μ opioid receptor expression in neuropathic mice //Brain, behavior, and immunity. – 2013. – T. 32. – P. 40-50. doi: 10.1016/j.bbi.2013.01.088
- 87 Marinelli S., Luvisetto S., Cobiański S., Makuch W., Obara I., Mezzaroma E., Caruso M., Straface E., Przewlocka B., Pavone F. Botulinum neurotoxin type A counteracts neuropathic pain and facilitates functional recovery after peripheral nerve injury in animal models //Neuroscience. – 2010. – T. 171(1). – P.316-328. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.08.067

- 88 Mika J., Rojewska E., Makuch W., Korostynski M., Luvisetto S., Marinelli S., Pavone F., Przewlocka B. The effect of botulinum neurotoxin A on sciatic nerve injury-induced neuroimmunological changes in rat dorsal root ganglia and spinal cord //Neuroscience. – 2011. – T. 175. – P. 358-366. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.11.040
- 89 Marinelli S., Vacca V., Ricordy R., Uggent, C., Tata A.M., Luvisetto S., Pavone F. The analgesic effect on neuropathic pain of retrogradely transported botulinum neurotoxin A involves Schwann cells and astrocytes //PLoS One. – 2012. – T. 7(10). – P. e47977. doi: 10.1371/journal.pone.0047977
- 90 Zychowska M., Rojewska E., Makuch W., Luvisetto S., Pavone F., Marinelli S., Przewlocka B., Mika J. Participation of pro-and anti-nociceptive interleukins in botulinum toxin A-induced analgesia in a rat model of neuropathic pain //European journal of pharmacology. – 2016. – T. 791. – P.377-388. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.09.019
- 91 Piotrowska A., Popiolek-Barczyk K., Pavone F., Mika J. Comparison of the expression changes after botulinum toxin type A and minocycline administration in lipopolysaccharide-stimulated rat microglial and astroglial cultures //Frontiers in cellular and infection microbiology. – 2017. – T. 7. – P.141. doi: 10.3389/fcimb.2017.00141
- 92 Sutton R.B., Fasshauer D., Jahn R., Brunger A.T. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution //Nature. – 1998. – T. 395(6700). – P.347-353. doi: 10.1038/26412
- 93 Lerman J.C., Robblee J., Fairman R., Hughson F.M. Structural analysis of the neuronal SNARE protein syntaxin-1A //Biochemistry. – 2000. – T. 39(29). – P.8470-8479. doi: 10.1021/bi0003994
- 94 Li L., Fierer J.O., Rapoport T.A., Howarth M. Structural analysis and optimization of the covalent association between SpyCatcher and a peptide Tag //Journal of molecular biology. – 2014. – T. 426(2). – P. 309-317. doi: 10.1016/j.jmb.2013.10.021
- 95 Harris J.A., Faust B., Gondin A.B., Dämgen M.A., Suomivuori C.M., Veldhuis N.A., Cheng Y., Dror R.O., Thal D.M., Manglik A. Selective G protein signaling driven by substance P–neurokinin receptor dynamics //Nature chemical biology. – 2022. – T. 18(1). – P. 109-115. doi: 10.1038/s41589-021-00890-8
- 96 Darios F., Niranjana D., Ferrari E., Zhang F., Soloviev M., Rummel A., Bigalke H., Suckling J., Ushkaryov Y., Naumenko N., Shakirzyanova A. SNARE tagging allows stepwise assembly of a multimodular medicinal toxin //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2010. – T. 107(42). – P.18197-18201. doi: 10.1073/pnas.1007125107
- 97 Fasshauer D., Eliason W.K., Brünger A.T., Jahn R. Identification of a minimal core of the synaptic SNARE complex sufficient for reversible assembly and disassembly //Biochemistry. – 1998. – T. 37(29). – P.10354-10362. doi: 10.1021/bi980542h
- 98 Ferrari E., Maywood E.S., Restani L., Caleo M., Pirazzini M., Rossetto O., Hastings M.H., Niranjana D., Schiavo G., Davletov B. Re-assembled botulinum neurotoxin inhibits CNS functions without systemic toxicity //Toxins. – 2011. – T.

3(4). – P. 345-355. doi: 10.3390/toxins3040345

99 Mangione A.S., Obara I., Maiarú M., Geranton S.M., Tassorelli C., Ferrari E., Leese C., Davletov B., Hunt S.P. Nonparalytic botulinum molecules for the control of pain //Pain. – 2016. – Т. 157(5). – P.1045-1055. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000478

100 Andreou A.P., Leese C., Greco R., Demartini C., Corrie E., Simsek D., Zanaboni A., Koroleva K., Lloyd J.O., Lambru G., Doran C. Double-binding botulinum molecule with reduced muscle paralysis: Evaluation in in vitro and in vivo models of migraine //Neurotherapeutics. – 2021. – Т. 18(1). – P. 556-568. doi: 10.1007/s13311-020-00967-7

101 Ferrari E., Gu C., Niranjan D., Restani L., Rasetti-Escargueil C., Obara I., Geranton S.M., Arsenault J., Goetze T.A., Harper C.B., Nguyen T.H. Synthetic self-assembling clostridial chimera for modulation of sensory functions //Bioconjugate chemistry. – 2013. – Т. 24(10). – P.1750-1759. doi: 10.1021/bc4003103

102 Schiavo G., Matteoli M., Montecucco C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis //Physiological reviews. – 2000. – Т. 80(2). – P.717-766. doi: 10.1152/physrev.2000.80.2.717

103 Maiarú M., Leese C., Certo M., Echeverria-Altuna I., Mangione A.S., Arsenault J., Davletov B., Hunt S.P. Selective neuronal silencing using synthetic botulinum molecules alleviates chronic pain in mice //Science Translational Medicine. – 2018. – Т. 10(450). – P. eaar7384. doi: 10.1126/scitranslmed.aar7384

104 Maiarú M., Leese C., Silva-Hucha S., Fontana-Giusti S., Tait L., Tamagnini F., Davletov B., Hunt S.P. Substance P-botulinum mediates long-term silencing of pain pathways that can be re-instated with a second injection of the construct in mice //The Journal of Pain. – 2024. – Т. 25(6). – P.104466

105 Leese C., Christmas C., Mészáros J., Ward S., Maiaru M., Hunt S.P., Davletov B. New botulinum neurotoxin constructs for treatment of chronic pain //Life Science Alliance. – 2023. – Т. 6(6). doi: 10.26508/lsa.202201631

106 Veggiani G., Zakeri B., Howarth M. Superglue from bacteria: unbreakable bridges for protein nanotechnology //Trends in biotechnology. – 2014. – Т. 32(10). – P. 506-512. doi: 10.1016/j.tibtech.2014.08.001

107 Клинический протокол диагностики и лечения «мигрень у взрослых». Министерство здравоохранения Республики Казахстан от «07» сентября 2023 года. Протокол №188. [Электронный ресурс]. URL <https://diseases.medelement.com/disease/мигрень-у-взрослых-кп-рк-2023/17775> (дата обращения 08.12.2024).

108 Scotton W.J., Botfield H.F., Westgate C.S., Mitchell J.L., Yiangou A., Uldall M.S., Jensen R.H., Sinclair A.J. Topiramate is more effective than acetazolamide at lowering intracranial pressure //Cephalalgia. – 2019. – Т. 39(2). – P. 209-218. doi:10.1177/0333102417738202

109 Bigal M.E., Serrano D., Reed M., Lipton R.B. Chronic migraine in the population: burden, diagnosis, and satisfaction with treatment //Neurology. – 2008. – Т. 71(8). – P.559-566. doi: 10.1212/01.wnl.0000323925.29520.e

110 Lloyd J. Investigations of mode of action of single pulse Transcranial Magnetic Stimulation (sTMS) in animal models and effectiveness in migraine patients.

[Электронный ресурс]. URL <https://kclpure.kcl.ac.uk/portal/en/studentTheses/investigations-of-mode-of-action-of-single-pulse-transcranial-mag> (дата обращения 10.01.2023).

111 Shankland W.E. The trigeminal nerve. Part II: the ophthalmic division. //Cranio. – 2001. – Т. 19(1). – P. 8-12. doi: 10.1080/08869634.2001.11746145

112 Eftekhari S., Salvatore C.A., Johansson S., Chen T.B., Zeng Z., Edvinsson L. Localization of CGRP, CGRP receptor, PACAP and glutamate in trigeminal ganglion. Relation to the blood–brain barrier //Brain research. – 2015. – Т. 1600. – P. 93-109. doi: 10.1016/j.brainres.2014.11.031

113 Juhasz G., Zsombok T., Modos E.A., Olajos S., Jakab B., Nemeth J., Szolcsanyi J., Vitrai J., Bagdy G. NO-induced migraine attack: strong increase in plasma calcitonin gene-related peptide (CGRP) concentration and negative correlation with platelet serotonin release //Pain. – 2003. – Т. 106(3). – P.461-470. doi: 10.1016/j.pain.2003.09.008

114 Asghar M.S., Hansen A.E., Amin F.M., Van Der Geest R.J., Koning P.V.D., Larsson H.B., Olesen J., Ashina M. Evidence for a vascular factor in migraine //Annals of neurology. – 2011. – Т. 69(4). – P. 635-645. doi: 10.1002/ana.22292

115 Lassen L.H., Haderslev P.A., Jacobsen V.B., Iversen H.K., Sperling B., Olesen J.C.G.R.P. CGRP may play a causative role in migraine //Cephalalgia. – 2002. – Т. 22(1). – P. 54-61. doi: 10.1046/j.1468-2982.2002.00310.x

116 Juhász G., Zsombok T., Jakab B., Nemeth J., Szolcsányi J., Bagdy G. Sumatriptan causes parallel decrease in plasma calcitonin gene-related peptide (CGRP) concentration and migraine headache during nitroglycerin induced migraine attack //Cephalalgia. – 2005. – Т. 25(3). – P.179-183. doi:10.1111/j.1468-2982.2005.00836.x

117 Rahmann A., Wienecke T., Hansen J.M., Fahrenkrug J., Olesen J., Ashina M. Vasoactive intestinal peptide causes marked cephalic vasodilation, but does not induce migraine //Cephalalgia. – 2008. – Т. 28(3). – P. 226-236. doi: 10.1111/j.1468-2982.2007.01497.x

118 Zagami A.S., Lambert G.A. Stimulation of cranial vessels excites nociceptive neurones in several thalamic nuclei of the cat //Experimental brain research. – 1990. – Т. 81. – P.552-566. doi: 10.1007/BF02423504

119 Zagami A.S., Lambert G.A. Craniovascular application of capsaicin activates nociceptive thalamic neurones in the cat //Neuroscience letters. – 1991. – Т. 121(1-2). – P. 187-190. doi: 10.1016/0304-3940(91)90681-I

120 Rasmussen R.H., Christensen S.L., Calloe K., Nielsen B.S., Rehfeld A., Taylor-Clark T.E., Haanes K.A., Taboureau O., Audouze K., Klaerke D.A., Olesen J. Xenobiotic exposure and migraine-associated signaling: a multimethod experimental study exploring cellular assays in combination with ex vivo and in vivo mouse models //Environmental Health Perspectives. – 2023. – Т. 131(11). – P.117003. doi: 10.1289/EHP12413

121 Nour K.H., Osuagwu U., Boyette-Davis J., Ringkamp M., Raja S.N., Dougherty P.M. Neurochemistry of somatosensory and pain processing //In Essentials of Pain Medicine. – 2018. – P. 11-20. doi: 10.1016/B978-0-323-40196-8.00002-4

122 Hepp Z., Bloudek L.M., Varon S.F. Systematic review of migraine prophylaxis adherence and persistence //Journal of Managed Care Pharmacy. – 2014.

- T. 20(1). – P.22-33. doi: 10.18553/jmcp.2014.20.1.22
- 123 Irimia P., Palma J.A., Fernandez-Torron R., Martinez-Vila E. Refractory migraine in a headache clinic population //BMC neurology. – 2011. – T. 11. – P.1-6. doi: 10.1186/1471-2377-11-94
- 124 Edvardsson B. Atenolol in the prophylaxis of chronic migraine: a 3-month open-label study //Springerplus. – 2013. – T. 2. – P. 1-5. doi: 10.1186/2193-1801-2-479
- 125 Jackson J.L., Kuriyama A., Kuwatsuka Y., Nickoloff S., Storch D., Jackson W., Zhang Z.J., Hayashino Y. Beta-blockers for the prevention of headache in adults, a systematic review and meta-analysis //PloS one. – 2019. – T. 14(3) – P. e0212785. doi: 10.1371/journal.pone.0212785
- 126 Linde K., Rossnagel K. Propranolol for migraine prophylaxis //Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2004. – T. 2. doi: 10.1002/14651858.CD003225.pub2
- 127 Sánchez-Rodríguez C., Sierra Á., Planchuelo-Gómez Á., Martínez-Pías E., Guerrero Á.L., García-Azorín D. Real world effectiveness and tolerability of candesartan in the treatment of migraine: a retrospective cohort study //Scientific Reports. – 2021. – T. 11(1). – P.3846. doi: 10.1038/s41598-021-83508-2
- 128 Guo Y., Han X., Yu T., Yao G. Meta-analysis of efficacy of topiramate in migraine prophylaxis //Neural Regeneration Research. – 2012. – T. 7(23). – P.1806-1811. doi: 10.3969/j.issn.1673-5374.2012.23.007
- 129 Couch J.R. Amitriptyline in the prophylactic treatment of migraine and chronic daily headache //Headache: The Journal of Head and Face Pain. – 2011. – T. 51(1). – P. 33-51. doi:10.1111/j.1526-4610.2010.01800.x
- 130 Diener H.C. Flunarizine for migraine prophylaxis //In Drug treatment of migraine and other headaches. – 2000. – T. 17. – P. 269-278. doi:10.1159/000061597
- 131 Pellesi L., De Icco R., Alawie H.Y., Andersen M., Liang D., Amirgulyev S., Al-Karagholi M.A.M., Amin F.M., Sessa M. A systematic review, meta-analysis and meta-regression evaluating the adverse reactions to erenumab in the preventive treatment of migraine //Expert Opinion on Drug Safety. – 2021. – T. 20(4). – P.467-474. doi:10.1080/14740338.2021.1866537
- 132 Lionetto L., Curto M., Cisale G.Y., Capi M., Cipolla F., Guglielmetti M., Martelletti P. Fremanezumab for the preventive treatment of migraine in adults //Expert Review of Clinical Pharmacology. – 2019. – T. 12(8). – P. 741-748. doi:10.1080/17512433.2019.1635452
- 133 Gklinos P., Mitsikostas D.D. Galcanezumab in migraine prevention: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials //Therapeutic Advances in Neurological Disorders. – 2020. – T. 13. – P.1756286420918088. doi:10.1177/1756286420918088
- 134 Spuntarelli V., Negro A., Luciani M., Bentivegna E., Martelletti P. Eptinezumab for the treatment of migraine //Expert Opinion on Biological Therapy. – 2021. – T. 21(8). – P.999-1011. doi: 10.1080/14712598.2021.1931678
- 135 Shen B., Wang L. Impact of the botulinum-A toxin on prevention of adult migraine disorders //Journal of integrative neuroscience. – 2020. – T. 19(1). – P. 201-208. doi: 10.31083/j.jin.2020.01.1240

- 136 Pradhan A.A., Smith M.L., McGuire B., Tarash I., Evans C.J., Charles A. Characterization of a novel model of chronic migraine //Pain. – 2014. – T. 155(2). –P. 269-274. doi: 10.1016/j.pain.2013.10.004
- 137 Olesen J., Iversen H.K., Thomsen L.L. Nitric oxide supersensitivity: a possible molecular mechanism of migraine pain //Neuroreport. – 1993. – T. 4(8). – P. 1027-1030.
- 138 Tassorelli C., Joseph S.A., Buzzi M.G., Nappi G. The effects on the central nervous system of nitroglycerin—putative mechanisms and mediators //Progress in neurobiology. – 1999. – T. 57(6). – P.607-624. doi: 10.1016/S0301-0082(98)00071-9
- 139 Tassorelli C., Joseph S.A., Nappi G. Reciprocal circuits involved in nitroglycerin-induced neuronal activation of autonomic regions and pain pathways: a double immunolabeling and tract-tracing study //Brain research. – 1999. – T. 842(2). – P. 294-310. doi: 10.1016/S0006-8993(99)01806-5
- 140 Iversen H.K., Olesen J., Tfelt-Hansen P. Intravenous nitroglycerin as an experimental model of vascular headache. Basic characteristics //Pain. – 1989. – T. 38(1). – P.17-24. doi: 10.1016/0304-3959(89)90067-5
- 141 Afridi K.S., Kaube H., Goadsby J.P. Glyceryl trinitrate triggers premonitory symptoms in migraineurs //Pain. – 2004. – T. 110(3). – P.675-680. doi: 10.1016/j.pain.2004.05.007
- 142 Sances G., Tassorelli C., Pucci E., Ghiotto N., Sandrini G., Nappi G. Reliability of the nitroglycerin provocative test in the diagnosis of neurovascular headaches //Cephalalgia. – 2004. – T. 24(2). – P.110-119. doi: 10.1111/j.1468-2982.2004.00639.x
- 143 Maniyar F.H., Sprenger T., Monteith T., Schankin C., Goadsby P.J. Brain activations in the premonitory phase of nitroglycerin-triggered migraine attacks //Brain. – 2014. – T. 137(1). – P. 232-241. doi: 10.1093/brain/awt320
- 144 Juhász G., Zsombok T., Jakab B., Nemeth J., Szolcsányi J., Bagdy G. Sumatriptan causes parallel decrease in plasma calcitonin gene-related peptide (CGRP) concentration and migraine headache during nitroglycerin induced migraine attack //Cephalalgia. – 2005. – T. 25(3). – P.179-183. doi: 10.1111/j.1468-2982.2005.00836.x
- 145 Tassorelli C., Joseph S.A., Nappi G. Central effects of nitroglycerin in the rat: new perspectives in migraine research //Functional neurology. – 1996. – T. 11(5). – P.219-235.
- 146 Pardutz A., Multon S., Malgrange B., Parducz A., Vecsei L., Schoenen J. Effect of systemic nitroglycerin on CGRP and 5-HT afferents to rat caudal spinal trigeminal nucleus and its modulation by estrogen //European Journal of Neuroscience. – 2002. – T. 15(11). – P.1803-1809. doi: 10.1046/j.1460-9568.2002.02031.x
- 147 Nagy-Grócz G., Tar L., Bohár Z., Fejes-Szabó A., Laborc K.F., Spekter E., Vécsei L., Párdutz Á. The modulatory effect of anandamide on nitroglycerin-induced sensitization in the trigeminal system of the rat //Cephalalgia. – 2016. – T. 36(9). –P. 849-861. doi: 10.1177/0333102415613766
- 148 Guo Z., Czerpaniak K., Zhang J., Cao Y.Q. Increase in trigeminal ganglion neurons that respond to both calcitonin gene-related peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in mouse models of chronic migraine and posttraumatic headache //Pain. – 2021. – T. 162(5). – P. 1483-1499. doi:

10.1097/j.pain.0000000000002147

149 Tipton A.F., Tarash I., McGuire B., Charles A., Pradhan A.A. The effects of acute and preventive migraine therapies in a mouse model of chronic migraine //Cephalalgia. – 2016. – T. 36(11). – P.1048-1056. doi: 10.1177/0333102415623070

150 Fejes-Szabó A., Bohár Z., Vámos E., Nagy-Grócz G., Tar L., Veres G., Zádori D., Szentirmai M., Tajti J., Szatmári I., Fülöp F. Pre-treatment with new kynurenic acid amide dose-dependently prevents the nitroglycerine-induced neuronal activation and sensitization in cervical part of trigemino-cervical complex //Journal of Neural Transmission. – 2014. – T. 121. – P.725-738. doi: 10.1007/s00702-013-1146-2

151 Mahmoudi J., Mohaddes G., Erfani M., Sadigh-Eteghad S., Karimi P., Rajabi M., Reyhani-Rad S., Farajdokht F. Cerebrolysin attenuates hyperalgesia, photophobia, and neuroinflammation in a nitroglycerin-induced migraine model in rats //Brain research bulletin. – 2018. – T. 140. – P.197-204. doi: 10.1016/j.brainresbull.2018.05.008

152 Harris H.M., Carpenter J.M., Black J.R., Smitherman T.A., Sufka K.J. The effects of repeated nitroglycerin administrations in rats; modeling migraine-related endpoints and chronification //Journal of Neuroscience Methods. – 2017. – T. 284. – P.63-70. doi: 10.1016/j.jneumeth.2017.04.010

153 Pradhan A.A., Smith M.L., Zyuzin J., Charles A. δ -Opioid receptor agonists inhibit migraine-related hyperalgesia, aversive state and cortical spreading depression in mice //British journal of pharmacology. – 2014. – T. 171(9). – P.2375-2384. doi: 10.1111/bph.12591

154 Kim S.J., Yeo J.H., Yoon S.Y., Kwon S.G., Lee J.H., Beitz A.J., Roh D.H. Differential development of facial and hind paw allodynia in a nitroglycerin-induced mouse model of chronic migraine: role of capsaicin sensitive primary afferents //Biological and Pharmaceutical Bulletin. – 2018. – T. 41(2). – P.172-181. doi: 10.1248/bpb.b17-00589

155 Moye L.S., Tipton A.F., Dripps I., Sheets Z., Crombie A., Violin J.D., Pradhan A.A. Delta opioid receptor agonists are effective for multiple types of headache disorders //Neuropharmacology. – 2019. – T. 148. – P. 77-86. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.12.017

156 Askari-Zahabi K., Abbasnejad M., Kooshki R., Raoof M., Esmaeili-Mahani S., Pourrahimi A.M., Zamyad M. The role of basolateral amygdala orexin 1 receptors on the modulation of pain and psychosocial deficits in nitroglycerin-induced migraine model in adult male rats //The Korean Journal of Pain. – 2022. – T. 35(1). – P.22-32. doi: 10.3344/kjp.2022.35.1.22

157 Zhang L., Zhou Y., Yang L., Wang Y., Xiao Z. PACAP6-38 improves nitroglycerin-induced central sensitization by modulating synaptic plasticity at the trigeminal nucleus caudalis in a male rat model of chronic migraine //The Journal of Headache and Pain. – 2023. – T. 24(1). – P.66. doi: 10.1186/s10194-023-01603-3

158 Magliano D.J., Boyko E.J. IDF diabetes atlas. – 2022. [Электронный ресурс]. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK581940/> (дата обращения от 19.07.2023).

159 Boulton A.J.M., Gries F.A.6 Jervell J.A. Guidelines for the diagnosis and outpatient management of diabetic peripheral neuropathy //Diabetic medicine. – 1998.

– T. 15(6). – P. 508-514.

160 Galer B.S., Ganas A., Jensen M.P. Painful diabetic polyneuropathy: epidemiology, pain description, and quality of life //Diabetes research and clinical practice. – 2000. – T. 47(2). – P.123-128. doi: 10.1016/S0168-8227(99)00112-6

161 Kaur S., Pandhi P., Dutta P. Painful diabetic neuropathy: an update //Annals of neurosciences. – 2011. – T. 18(4). – P. 168. doi: 10.2174/1573399816666201103142521

162 Dworkin R.H., O'connor A.B., Backonja M., Farrar J.T., Finnerup N.B., Jensen T.S., Kalso E.A., Loeser J.D., Miaskowski C., Nurmikko T.J., Portenoy R.K. Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations //Pain. – 2007. – T. 132(3). – P.237-251. doi: 10.1016/j.pain.2007.08.033

163 Bragg S., Marrison S.T., Haley S. Diabetic Peripheral Neuropathy: Prevention and Treatment //American Family Physician. – 2024. – T. 109(3). – P.226-232.

164 Kottaisamy C.P.D., Raj D.S., Prasanth Kumar V., Sankaran U. Experimental animal models for diabetes and its related complications—a review //Laboratory animal research. – 2021. – T. 37(1). – P.23. doi: 10.1186/s42826-021-00101-4

165 Wei M., Ong L., Smith M.T., Ross F.B., Schmid K., Hoey A.J., Burstow D., Brown L. The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes //Heart, lung and circulation. – 2003. – T. 12(1). – P. 44-50. doi: 10.1046/j.1444-2892.2003.00160.x

166 Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas //Physiological research. – 2001. – T. 50(6). – P. 537-546.

167 Elsner M., Guldbakke B., Tiedge M., Munday R., Lenzen S. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin //Diabetologia. – 2000. – T. 43. – P.1528-1533. doi: 10.1007/s001250051564

168 Kaur M., Bedi O., Sachdeva S., Reddy B.K., Kumar P. Rodent animal models: from mild to advanced stages of diabetic nephropathy //Inflammopharmacology. – 2014. – T. 22. – P.279-293. doi: 10.1007/s10787-014-0215-y

169 Morrow T.J. Animal models of painful diabetic neuropathy: the STZ rat model //Current protocols in neuroscience. – 2004. – T. 29(1). – P. 9-18. doi: 10.1002/0471142301.ns0918s29

170 Fuchs D., Birklein F., Reeh P.W., Sauer S.K. Sensitized peripheral nociception in experimental diabetes of the rat //Pain. – 2010. – T. 151(2). – P. 496-505. doi: 10.1016/j.pain.2010.08.010

171 Chundi V., Challa S.R., Garikapati D.R., Juvva G., Jampani A., Pinnamaneni S.H., Venigalla S. Biochanin-A attenuates neuropathic pain in diabetic rats //Journal of Ayurveda and integrative medicine. – 2016. – T. 7(4). – P. 231-237. doi: 10.1016/j.jaim.2016.08.001

172 Mittal R., Kumar A., Singh D.P., Bishnoi M., Nag T.C. Ameliorative potential of rutin in combination with nimesulide in STZ model of diabetic neuropathy: targeting Nrf2/HO-1/NF-kB and COX signalling pathway //Inflammopharmacology. – 2018. – T. 26. – P.755-768. doi: 10.1007/s10787-017-0413-5

173 Niknia S., Kaeidi A., Hajizadeh M.R., Mirzaei M.R., Khoshdel A., Hajializadeh Z., Fahmidehkar M.A., Mahmoodi M. Neuroprotective and antihyperalgesic effects of orexin-A in rats with painful diabetic neuropathy //Neuropeptides. – 2019. – Т. 73. – P. 34-40. doi: 10.1016/j.npep.2018.11.001

174 Vieira W.F., Malange K.F., de Magalhães S.F., Dos Santos G.G., de Oliveira A.L.R., da Cruz-Höfling M.A., Parada C.A. Gait analysis correlates mechanical hyperalgesia in a model of streptozotocin-induced diabetic neuropathy: A CatWalk dynamic motor function study //Neuroscience letters. – 2020. – Т. 736. – P.135253. doi: 10.1016/j.neulet.2020.135253

175 Kaur N., Kishore L., Farooq S.A., Kajal A., Singh R., Agrawal R., Mannan A., Singh T.G. Cucurbita pepo seeds improve peripheral neuropathy in diabetic rats by modulating the inflammation and oxidative stress in rats //Environmental Science and Pollution Research. – 2023. – Т. 30(36). – P. 85910-85919. doi: 10.1007/s11356-023-28339-6

176 Bayir M.H., Yıldızhan K., Altındağ F. Effect of hesperidin on sciatic nerve damage in STZ-induced diabetic neuropathy: modulation of TRPM2 channel //Neurotoxicity Research. – 2023. – Т. 41(6). – P.638-647. doi: 10.1007/s12640-023-00657-0

177 Об утверждении Правил обращения с животными Приказ Министра сельского хозяйства Республики Казахстан от 30 декабря 2014 года № 16-02/701. Зарегистрирован в Министерстве юстиции Республики Казахстан 4 февраля 2015 года № 10183. [Электронный ресурс]. URL <https://adilet.zan.kz/rus/docs/V14F0010183> (дата обращения 20.05.2022).

178 Об ответственном обращении с животными Закон Республики Казахстан от 30 декабря 2021 года № 97-VII ЗРК. [Электронный ресурс]. URL <https://adilet.zan.kz/rus/docs/Z2100000097> (дата обращения 20.05.2022).

179 Field M., Splevins A., Picaut P., Van der Schans M., Langenberg J., Noort D., Foster K. AbobotulinumtoxinA (Dysport®), OnabotulinumtoxinA (Botox®), and IncobotulinumtoxinA (Xeomin®) neurotoxin content and potential implications for duration of response in patients //Toxins. – 2018. – Т. 10(12). – P.535. doi: 10.3390/toxins10120535

180 Landis J.R., Koch G.G. The measurement of observer agreement for categorical data //Biometrics. – 1977. – P.159-174.

181 Wang-Fischer Y., Garyantes T. Improving the Reliability and Utility of Streptozotocin-Induced Rat Diabetic Model //Journal of diabetes research. – 2018. – P. 8054073. doi: 10.1155/2018/8054073

182 Saghaizadeh-Dezfuli M., Fanaei H., Gharib-Naseri M. K., Nasri S., Mard S. A. Antidiarrheal effect of sodium hydrosulfide in diabetic rats: In vitro and in vivo studies //Neurogastroenterology and motility. – 2018. – Т. 30(10). – P. e13273. doi: 10.1111/nmo.13273

183 Grimace scale: Rat [Электронный ресурс]. URL <https://www.nc3rs.org.uk/3rs-resources/grimace-scales/grimace-scale-rat> (дата обращения 25.07.2024).

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Заключение локальной этической комиссии

«ӘЛ-ФАРАБИ АТЫНДАҒЫ
ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ»
КОММЕРЦИЯЛЫҚ ЕМЕС АКЦИОНЕРЛІК ҚОҒАМЫ

ҒЫЛЫМ ЖӘНЕ ИННОВАЦИЯЛЫҚ
ҚЫЗМЕТ ЖӨНІНДЕГІ ДЕПАРТАМЕНТІ
ЖЕРГІЛІКТІ ЭТИКАЛЫҚ КОМИТЕТ



НЕКОММЕРЧЕСКОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«КАЗАХСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ АЛЬ-ФАРАБИ»

ДЕПАРТАМЕНТ ПО НАУКЕ
И ИННОВАЦИОННОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ
ЛОКАЛЬНЫЙ ЭТИЧЕСКИЙ КОМИТЕТ

От _____ № 89
На № _____ от _____

Заключение Локального Этического комитета

1.	ФИО докторанта	Жантлеуова Айша Канатовна
2.	Специальность (образовательная программа) докторантуры	8D05109 - Нейронаука
3.	Период обучения в докторантуре	2021-2024
4.	Тема диссертации, дата утверждения	Исследование воздействия непарализующих молекул ботулина на нервную функцию
5.	Данные о научных консультантах - Ф.И.О. (при его наличии), должности и места работы, ученые степени, гражданство	Каримова Алтынай Сагидуллаевна, к.м.н., доцент Южно-Казахстанской государственной медицинской академии, Казахстан Давлетов Базбек Абубакирович, д.б.н., профессор Шеффилдского университета, Великобритания
6.	Объекты исследования	крысы
7.	Нарушения в процессе планирования, оценки, отбора и проведения научных исследований	Не выявлены
8.	Нарушения в процессе распространения результатов научных исследований	Не выявлены
9.	Каким образом проводилась защита прав, безопасности и благополучия объектов исследования (в случае наличия объектов живой природы и среды обитания)?	Диссертационная работа соответствует этическим нормам и нормам законодательства РК. Соблюдены условия для минимизирования использования объектов живой природы, а также приняты меры для снятия боли и других неприятных ощущений, если это не влияет на результаты исследования.
10.	Номер одобрения	IRB-377
11.	Дата одобрения исследования	24.02.2022
12.	Дата истечения одобрения	23.02.2025

Председатель Локального Этического комитета Усатеева Г.М. Усатеева Г.М.
Секретарь Локального Этического комитета Шаухарова М.А. Шаухарова М.А.

Рисунок А1 – Заключение ЛЭК №IRB-377 от 24.02.2022

№ 1-5
Алматы қаласы

№ 18.11.22
город Алматы

Одобрение Локального Этического Комитета

Название диссертационного исследования: **«Исследование воздействия
непарализующих молекул ботулина на нервную функцию»**

Протокол № IRB – A377

(IRB00010790 al-Farabi Kazakh National University IRB #1)

Дата получения одобрения: 24.02.2022 г.

Дата истечения одобрения: 23.02.2025 г.

17 ноября 2022 г. на заседании Локального Этического комитета было рассмотрено заявление докторанта специальности «8D05109 – Нейронаука» Жантлеуовой А. К. на внесение изменений в протокол исследования. Документ с вносимыми изменениями в протокол исследования был приложен к заявлению докторанта. Вносимые изменения соответствуют целям и задачам исследования, поэтому было принято решение одобрить их.

Исследователи обязаны информировать Локальный Этический Комитет о любых предполагаемых изменениях в протоколе заранее и предоставлять необходимые документы в ЛЭК для рассмотрения, за исключением тех случаев, когда подобные изменения необходимы для немедленного предотвращения вреда для участников исследования. Также, о любых серьезных и неожиданных неблагоприятных событиях или других осложнениях, представляющих риск для субъектов исследования, должно быть доложено Локальному Этическому Комитету в кратчайшие сроки.

Заявки на продление одобрения должны подаваться не позднее 30 дней до даты истечения срока одобрения данного исследования вместе с отчетом о выполненной работе.

Председатель ЛЭК



Г.М. Усатаева

Рисунок А2 – Дополнение ЛЭК №IRB-A377 от 18.11.2022

№ 444
Алматы қаласы

№ _____
город Алматы

Заключение Локального Этического комитета

1.	ФИО докторанта	Жантлеуова Айша Канатовна
2.	Специальность (образовательная программа) докторантуры	8D05109 - Нейронаука
3.	Период обучения в докторантуре	2021-2024
4.	Тема диссертации, дата утверждения	Исследование воздействия непарализующих молекул ботулина на нервную функцию, 09.12.2021
5.	Данные о научных консультантах - Ф.И.О. (при его наличии), должности и места работы, ученые степени, гражданство	Каримова Алтынай Сагидуллаевна, к.м.н., старший преподаватель Казахского-национального университета имени аль-Фараби Давлетов Базбек Абубакирович, д.б.н., профессор Шеффилдского университета, Великобритания
6.	Объекты исследования	крысы
7.	Нарушения в процессе планирования, оценки, отбора и проведения научных исследований	Не выявлены
8.	Нарушения в процессе распространения результатов научных исследований	Не выявлены
9.	Каким образом проводилась защита прав, безопасности и благополучия объектов исследования (в случае наличия объектов живой природы и среды обитания)?	Диссертационная работа соответствует этическим нормам и нормам законодательства РК. Соблюдены условия для минимизирования использования объектов живой природы, а также приняты меры для снятия боли и других неприятных ощущений, если это не влияет на результаты исследования.
10.	Номер одобрения	IRB-377
11.	Срок действия одобрения исследования	24.02.2022- 21.05.2025
12.	Дата выдачи заключения	09.01.2025

Председатель Локального Этического комитета _____ Усенова Г.М.

Секретарь Локального Этического комитета _____ Ибрахимова М.А.



Рисунок А3 – Заключение ЛЭК №IRB-377 от 09.01.2025

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Шкала гримасы крысы



**NC
3Rs**

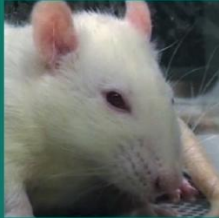
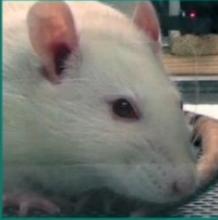
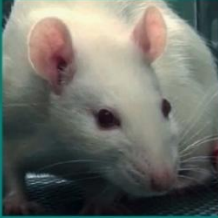
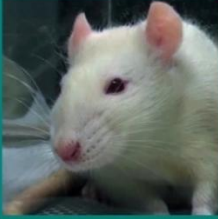
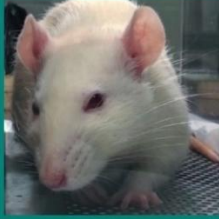
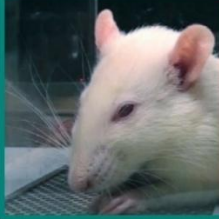
National Centre
for the Replacement
Refinement & Reduction
of Animals in Research

The Rat Grimace Scale

Research has demonstrated that changes in facial expression provide a means of assessing pain in rats.

The specific facial action units shown below have been used to generate the Rat Grimace Scale. These action units increase in intensity in response to post-procedural pain and can be used as part of a clinical assessment.

The action units should only be used in awake animals. Each animal should be observed for a short period of time to avoid scoring brief changes in facial expression that are unrelated to the animal's welfare.

	Not present "0"	Moderately present "1"	Obviously present "2"
Orbital tightening ▪ Closing of the eyelid (narrowing of orbital area) ▪ A wrinkle may be visible around the eye			
Nose/cheek flattening ▪ Flattening and elongation of the bridge of the nose ▪ Flattening of the cheeks (potentially sunken look)			
Ear changes ▪ Ears curl inwards and are angled forward to form a 'pointed' shape ▪ Space between the ears increases			
Whisker change ▪ Whiskers stiffen and angle along the face ▪ Whiskers may 'clump' together ▪ Whiskers lose their natural 'downward' curve			

Read the original paper:
Sotocinal SG, Sorge RE, Zeloum A, Tuttle AH, Martin LJ, Wieskopf JS, Mapplebeck JCS, Wei P, Zhan S, Zheng S, McDougall JJ, King OD, Mogil JS. 2011. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Molecular Pain* 7: 55. doi:10.1186/1744-8069-7-55

For guidance on using the Rat Grimace Scale, research papers that underpin this technique, and for grimace scales in other species, visit: www.nc3rs.org.uk/grimacescales
To request copies of this poster, please email: enquiries@nc3rs.org.uk
The NC3Rs provides a range of 3Rs resources at: www.nc3rs.org.uk/resources
Images kindly provided by Dr Jeffrey Mogil, McGill University

Рисунок Б1 – Постер ШГК от Национального центра по замене, совершенствованию и сокращению использования животных в исследованиях [183]