



МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В.ЛОМОНОСОВА  
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ  
КАФЕДРА ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ



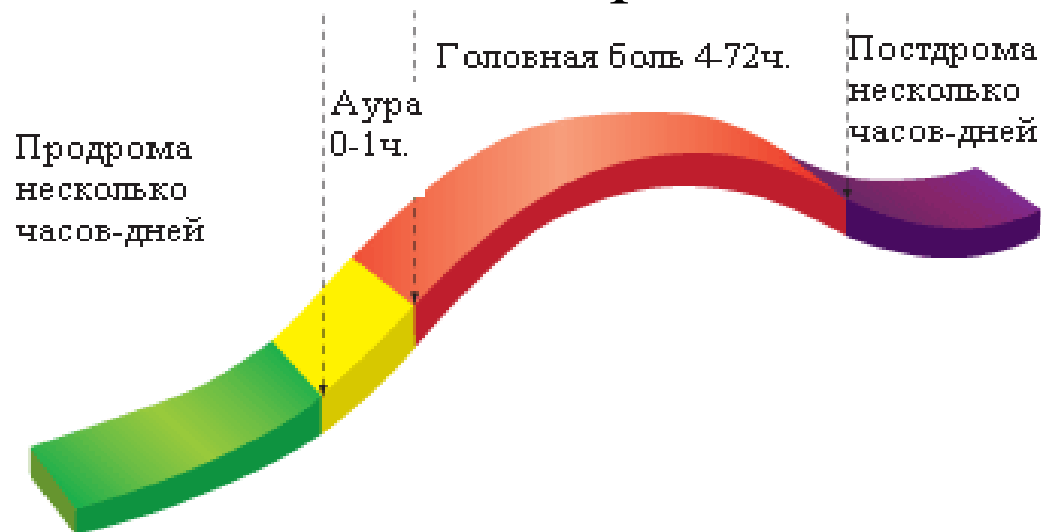
# Разработка новой фармакологической модели мигрени на грызунах

New pharmacological model of migraine: development on rodents

К. б. н., с.н.с. Рудько О.И.

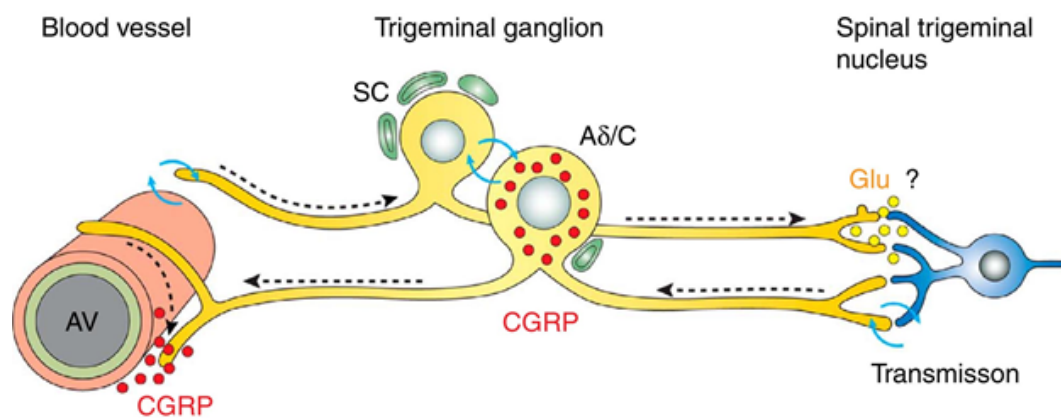
Москва - 2022

# Фазы мигрени



- I - нарушение концентрации внимания, зевота, усталость и чувствительность к свету и звуку.
- II - Зрительные иллюзии в виде искр или вспышек, вслед за которыми часто появляются слепые или темные пятна той же формы, что и предшествующие им яркие галлюцинации.
- III - Мучительная боль, сопровождающаяся чувствительностью к свету и звукам, тошнотой и рвотой; нередко боль охватывает половину головы
- IV - Сохранение болезненной чувствительности к свету и движению, а также сонливость, усталость и затрудненное концентрирование внимания; некоторые пациенты описывают это состояние или фазу «зомби».

# CGRP = вазодилатация + боль

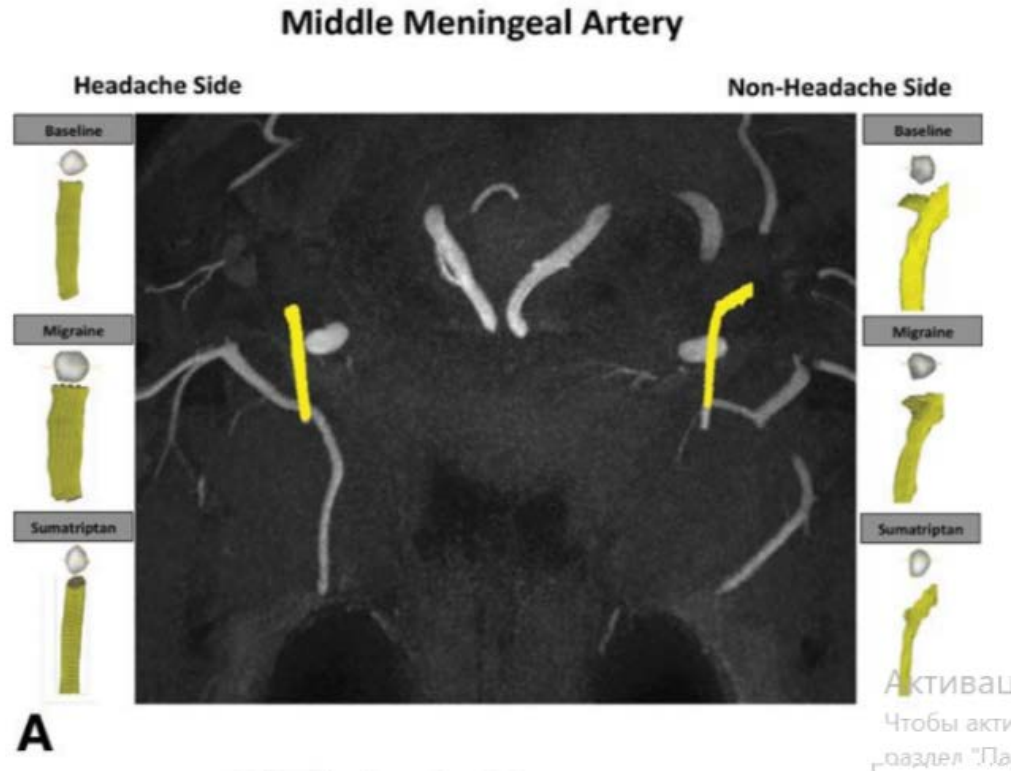


Кальцитонингенсвязанный пептид является самым сильным из известных пептидергических вазодилататоров, действующих на периферические и мозговые сосуды. Его действие в 10 раз сильнее, чем у простагландинов, и на 2-3 порядка больше, чем у других классических вазодилататоров, включая ацетилхолин, аденозин, 5-НТ и вещество Р (Geppetti et al., 2005).

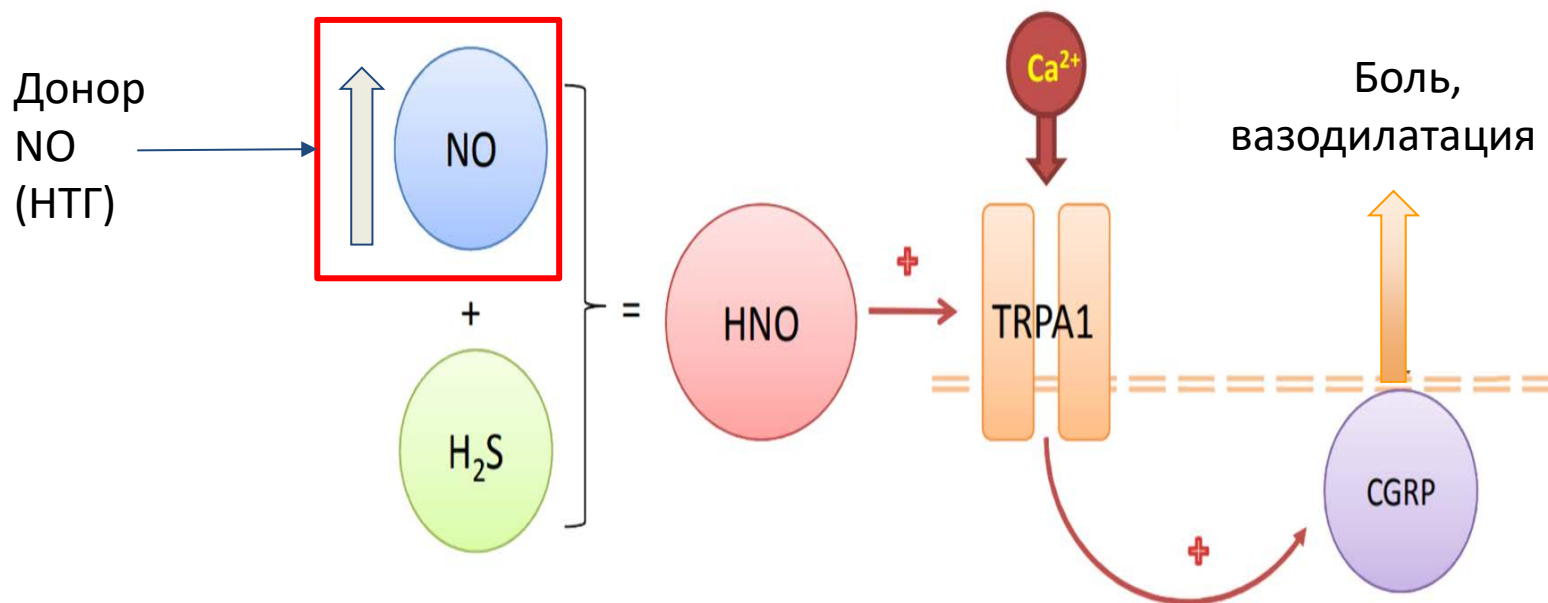
- активирует вазодилатацию, за счёт релаксации гладкой мускулатуры сосудов, и боль, взаимодействуя с афферентом тройничного нерва. При этом сигнал возвращается на окончание нерва и повторно активирует приток кальция и выброс CGRP.
- Соответственно, приводя к образованию единожды запущенного цикла, выброс CGRP запускает цикл реакций, приводящих к возникновению самого приступа боли и сопутствующей вазодилатации. Окончание мигренозной атаки являет собой затухание этого циклического сигнала и может быть связано с истощением CGRP.

# Кальцитонингенсвязанный пептид

Доказательством активации ТВС (тригеминально-васкулярной системы) у людей во время приступа мигрени является повышение уровня CGRP в сыворотке крови, который обнаруживается в восходящем и нисходящем шейном кровотоке при мигренозной атаке, и его возвращение к нормальному уровню после лечения суматриптанами и последующего избавления от головной боли (Piterobon and Striessing, 2003).



NO и H<sub>2</sub>S- свободно проникают через мембраны клеток. Взаимодействуя, они образуют молекулу нитроксил (HNO), которая активирует на окончании тройничного нерва TRPA1 рецептор, это приводит к притоку кальция в клетку. Внутриклеточный кальций активирует экзоцитоз и выброс CGRP.



\*НТГ - нитроглицерин

# МОДЕЛЬ СЕНСОРНОЙ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

Самой распространённой фармакологической моделью мигрени на данный момент .

Показано, что хроническое прерывистое введение нитроглицерина способно приводить к выраженной гиперестезии у мышей<sup>1</sup>. Данная гиперестезия чувствительна к введению суматриптана и на молекулярном уровне сопровождается изменениями, характерными для приступов мигрени у человека<sup>2,3</sup>.

В настоящее время «нитроглицериновая» модель признана наиболее изученной и валидированной фармакологической моделью мигрени человека у грызунов, пригодной для изучения влияния антимигрениозных лекарственных средств<sup>4</sup>.

## Используемые тесты:

	<b>острая болевая чувствительность</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• термическое раздражение (Hot plate)</li></ul>
	<b>гипералгезия</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• модель хронического воспалительного процесса</li><li>• Тактильная чувствительность (тест фон Фрея)</li></ul>
	<b>аллодиния</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Тактильная чувствительность (тест фон Фрея)</li></ul>

1. Olesen J, Jansen-Olesen I. Towards a reliable animal model of migraine. //Cephalalgia. 2012 May;32(7):578-80. doi: 10.1177/0333102412441719.

2. Akerman S, Holland PR, Hoffmann J. Pearls and pitfalls in experimental in vivo models of migraine: dural trigeminovascular nociception. // Cephalalgia. 2013 Jun;33(8):577-92. doi: 10.1177/0333102412472071. Review.

3. Pradhan AA, Smith ML, McGuire B, Tarash I, Evans CJ, Charles A. Characterization of a novel model of chronic migraine. // Pain. 2014 Feb;155(2):269-74. doi: 10.1016/j.pain.2013.10.004.

4. Romero-Reyes M, Akerman S. Update on animal models of migraine. Curr Pain Headache Rep. 2014 Nov;18(11):462. doi: 10.1007/s11916-014-0462-z.

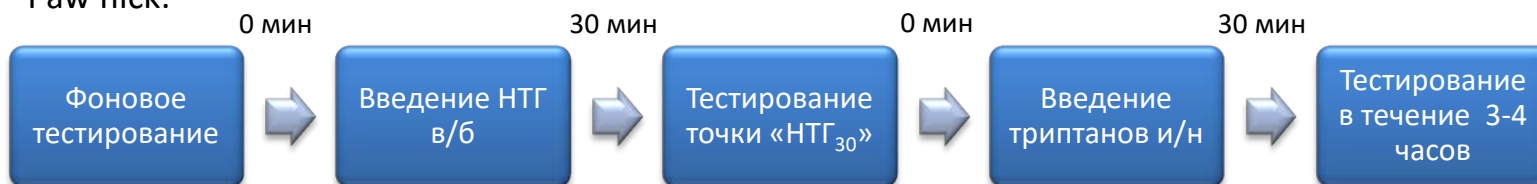
## Дизайн эксперимента:

Группа	Парентерально:	Интраназально:
контроль	Растворитель *	Растворитель **
НТГ	НТГ 10 мг/кг	Растворитель **
НТГ+суматриптан	НТГ 10 мг/кг	суматриптан 0,6 мг/кг
НТГ+фроватриптан	НТГ 10 мг/кг	фроватриптан 5 мг/кг

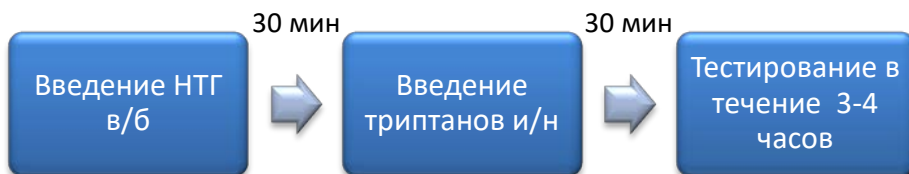
\* - растворитель 13,75% раствор спирта этилового в ФСБР

\*\* - растворитель 0,4% раствор ДМСО в ФСБР

### Raw flick:



### Von Frey test:



## 2. Исследование переносимости хронической боли

Тест тактильной чувствительности (фон Фрея) представляет собой набор пластиковых нитей, увеличивающихся в диаметре.



Процедура тестирования является титрованием, при котором поочередно прикладывают нити разного диаметра, в зависимости от наблюдаемой реакции:

если животное отреагировало на стимуляцию, используют нить меньшего диаметра, если нет – большего<sup>3</sup>.

Окончание эксперимента наблюдают по отдергиванию лапы грызуна. У каждой мыши порог поочередно определяют на каждой лапе.

**Феномен гиперестезии** играет важнейшую роль в патогенезе мигрени и во многом определяет ее клиническую картину.

В рамках нитроглицерин-индуцированной модели мигрени возможно рассмотрение двух проявлений мигренозной гиперестезии:

**Гипералгезия** - повышенная реакция на обычное болезненное раздражение (первичная гипералгезия).

**Аллодиния** — восприятие неболевого воздействия как болевого (вторичная гипералгезия).

Для достижения гиперсенсibilизации нервных окончаний и усиления нитроглицерин-индуцированной гиперестезии у животных всех групп предварительно формировался хронический воспалительный процесс на одной из лап.

Воспалительный процесс формировался субплантарным введением 5 мкл полного адьюванта Фрейнда за 72 часа до начала 1го тестирования препаратов<sup>1,2</sup>.

1. Д.А. Бондаренко и др. In vivo модели для изучения анальгетической активности // Биомедицина № 2, 2011:84-94.

2. Gavva NR et al. AMG 9810 [(E)-3-(4-t-butylphenyl)-N-(2,3-dihydrobenzo[b][1,4] dioxin-6-yl)acrylamide], a novel vanilloid receptor 1 (TRPV1) antagonist with antihyperalgesic properties.// J Pharmacol Exp Ther. 2005 Apr;313(1):474-84.

3. Chaplan S.R., Bach F.W., Pogrel J.W. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw // J. Neurosci Methods. -1994 -Vol.53. -P.55-63.



# 1. Исследование переносимости острой боли (Hot plate)

Введение суматриптана и фроватриптана сходным образом нормализует уровень болевой чувствительности мышей в тесте hot plate.

По выраженности и уровню статистической значимости эффекта фроватриптан незначительно превосходит суматриптан, однако разница между опытными группами не достоверна. Различия между контрольной группой и опытными группами "нитроглицерин+суматриптан" и "нитроглицерин+фроватриптан" статистически незначимы.

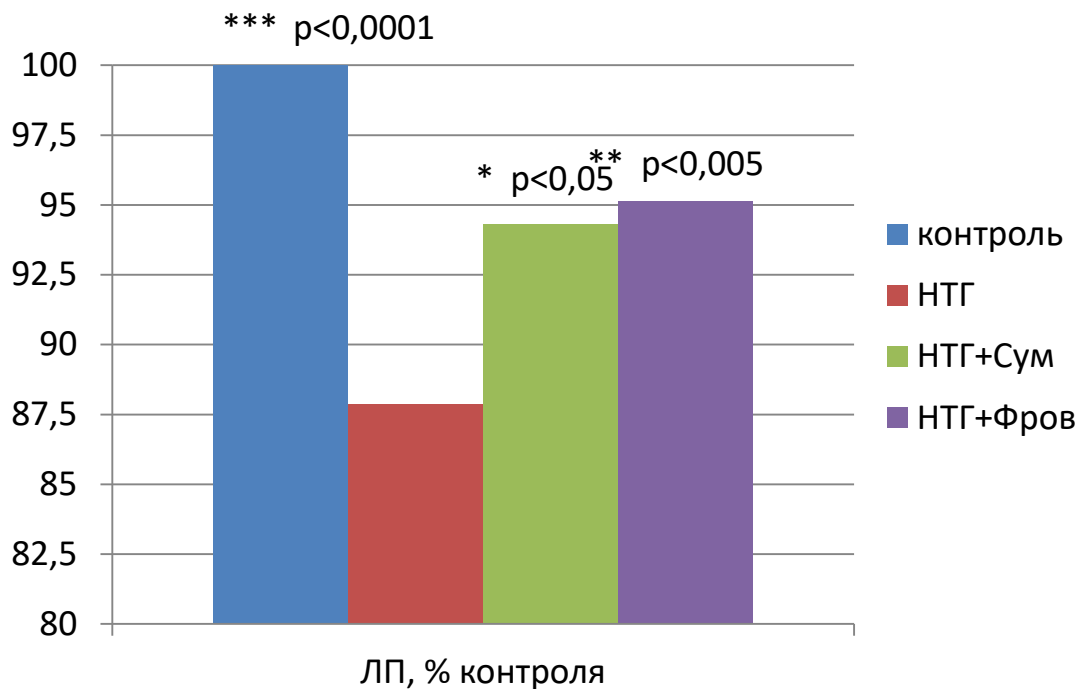


Рис.1 Суммарные показатели латентного периода болевой реакции за все время тестирования (% контроля)

\* -p<0,05; \*\* - p<0,005; \*\*\* - p<0,0001 относительно значений группы "нитроглицерин" по t-критерию для независимых выборок и по U-критерию;

Нормализующий эффект фроватриптана на латентный период болевой реакции мышей, который по своей направленности схож с эффектами суматриптана, наблюдался в течение всего тестирования (hot plate).

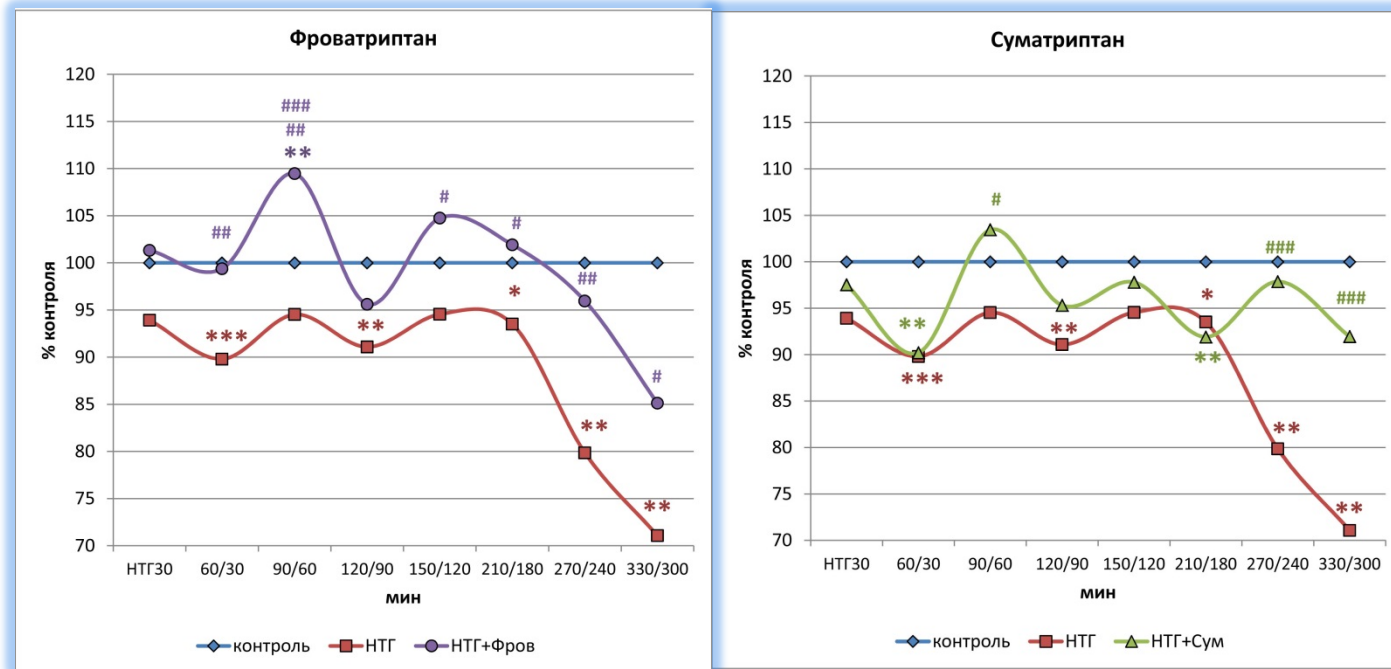


Рис.2 Нормированные показатели изменения латентного периода болевой реакции в зависимости от времени тестирования. По оси ординат - % контроля, по оси абсцисс – время после введения нитроглицерина/препарата, минут.

\* - статистически значимое отличие от группы «контроль»

\* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,005$  по *t*-критерию для независимых выборок.

# - статистически значимое отличие от группы «нитроглицерин»

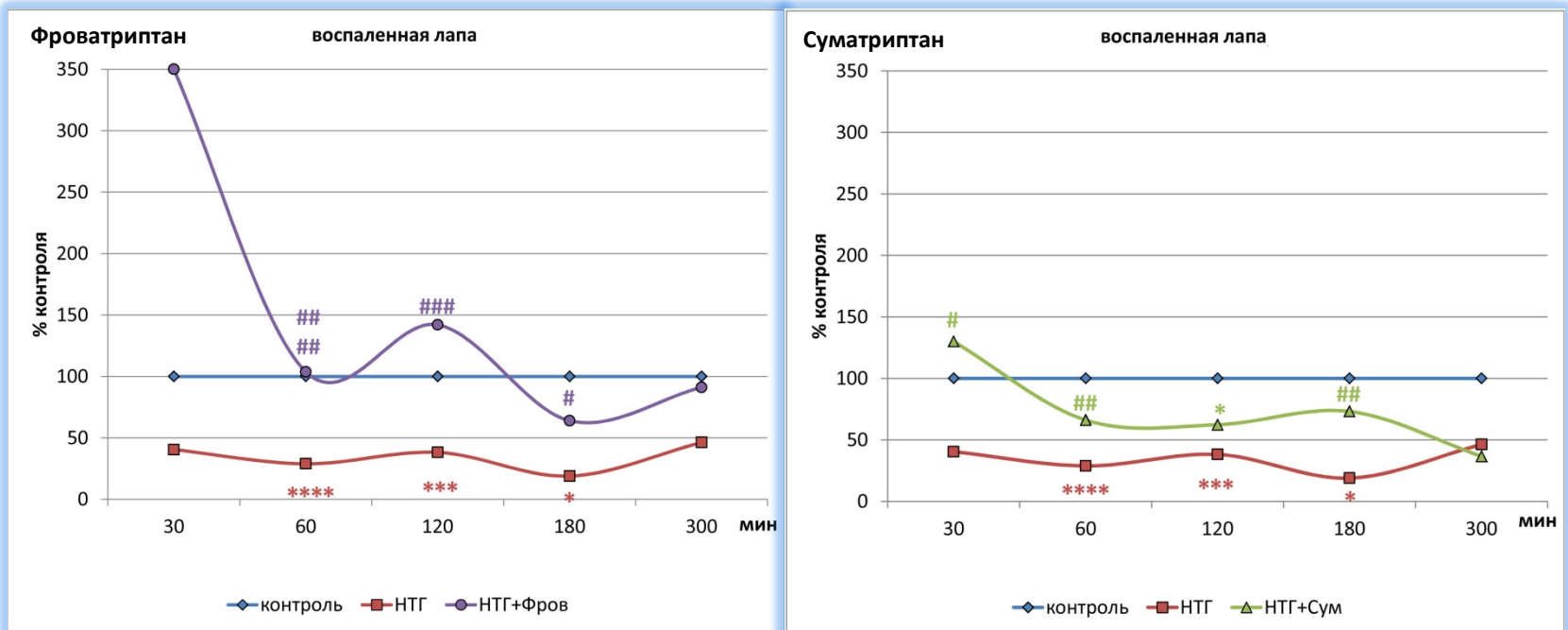
# -  $p < 0,05$ ; ## -  $p < 0,01$ ; ### -  $p < 0,005$ ; #### -  $p < 0,001$ ; ##### -  $p < 0,0005$  по *t*-критерию для независимых выборок.

**Первичная гипералгезия** связана с местом повреждения тканей и возникает в основном в ответ на раздражение сенсibilизированных в результате повреждения периферических ноцицепторов.

Значительное снижение порога тактильной чувствительности воспаленной лапы у мышей группы «нитроглицерин» является следствием нитроглицерин-индуцированной гипералгезии.

**Интраназальное введение фроватриптана** статистически значительно повышает пороги тактильной чувствительности больной лапы мышей в тесте фон Фрея, что свидетельствует о выраженном анальгетическом эффекте препарата, превосходящем эффект суматриптана.

Наблюдаемые изменения сохранялись в течение 5 часов после введения фроватриптана.



**Рис.3** Нормированные показатели тактильной чувствительности в зависимости от времени после введения препаратов. По оси ординат - % контроля, по оси абсцисс – время после введения препарата, минут.

\* - статистически значимое отличие от группы «контроль»

\* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,005$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* -  $p < 0,0005$ ; \*\*\*\*\* -  $p < 0,00001$  по *t*-критерию для независимых выборок.

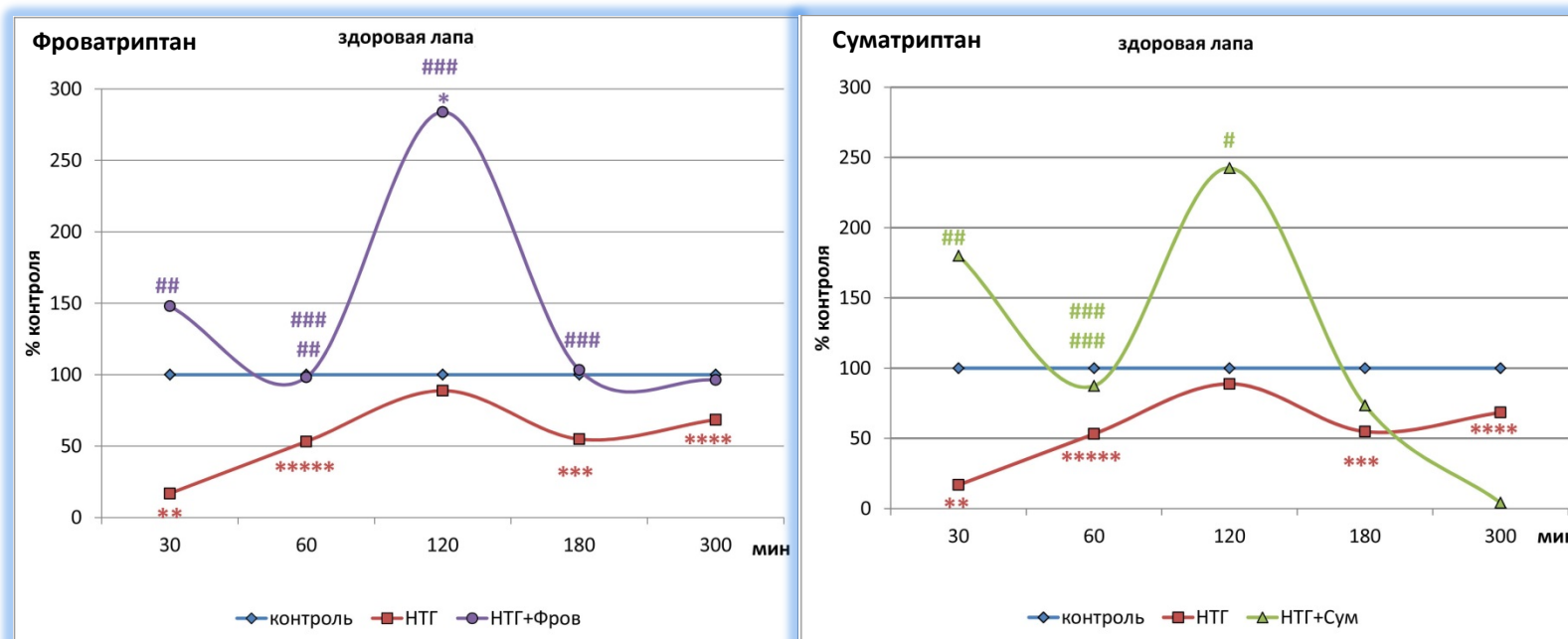
# - статистически значимое отличие от группы «нитроглицерин»

# -  $p < 0,05$ ; ## -  $p < 0,005$ ; ### -  $p < 0,001$ ; #### -  $p < 0,0005$ ; ##### -  $p < 0,00005$ ; ##### -  $p < 0,00001$  по *t*-критерию для независимых выборок.

**Кожная аллодиния** является маркером центральной сенсibilизации и может быть легко продемонстрирована у пациентов с мигренью. Клинически показана недостаточная эффективность ее терапии классическими триптанами.

Значительное снижение порога тактильной чувствительности здоровой лапы у животных группы «нитроглицерин» может также трактоваться как аллодиния.

**Интраназальное введение фроватриптана** статистически значимо повышает пороги тактильной чувствительности здоровой лапы мышей в тесте фон Фрея, что свидетельствует о реализации анальгетического эффекта в ЦНС и возможной эффективности интраназальной формы препарата при кожной аллодинии.



**Рис.4** Нормированные показатели тактильной чувствительности в зависимости от времени после введения препаратов. По оси ординат - % контроля, по оси абсцисс – время после введения препарата, минут.

\* - статистически значимое отличие от группы «контроль»

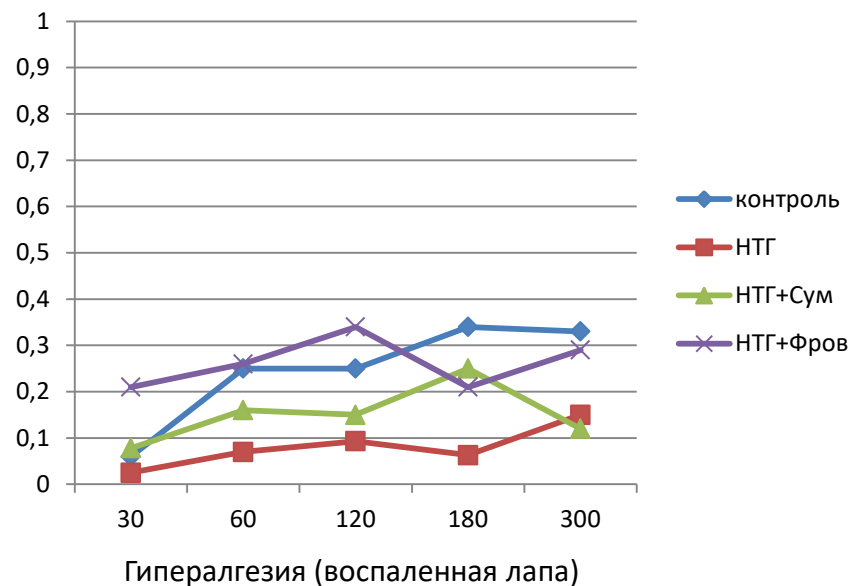
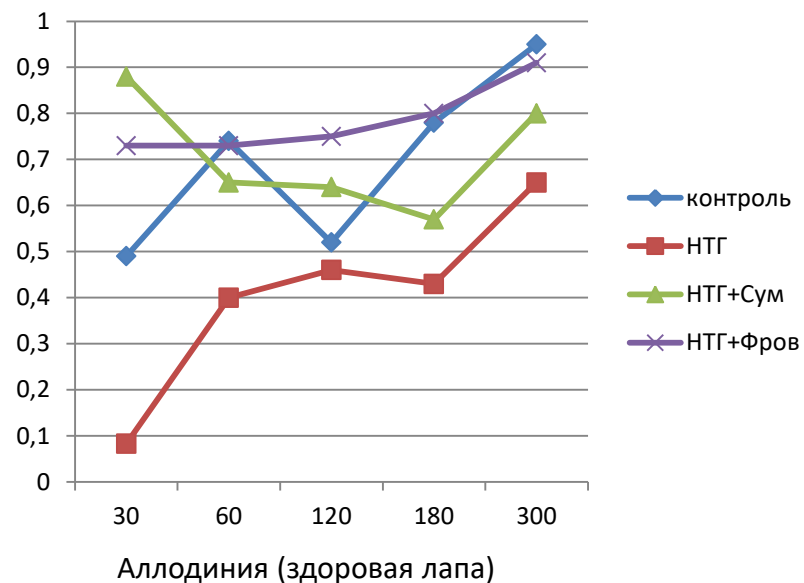
\* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,005$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* -  $p < 0,0005$ ; \*\*\*\*\* -  $p < 0,00001$  по t-критерию для независимых выборок.

# - статистически значимое отличие от группы «нитроглицерин»

# -  $p < 0,05$ ; ## -  $p < 0,005$ ; ### -  $p < 0,001$ ; #### -  $p < 0,0005$ ; ##### -  $p < 0,00005$ ; ##### -  $p < 0,00001$  по t-критерию для независимых выборок.

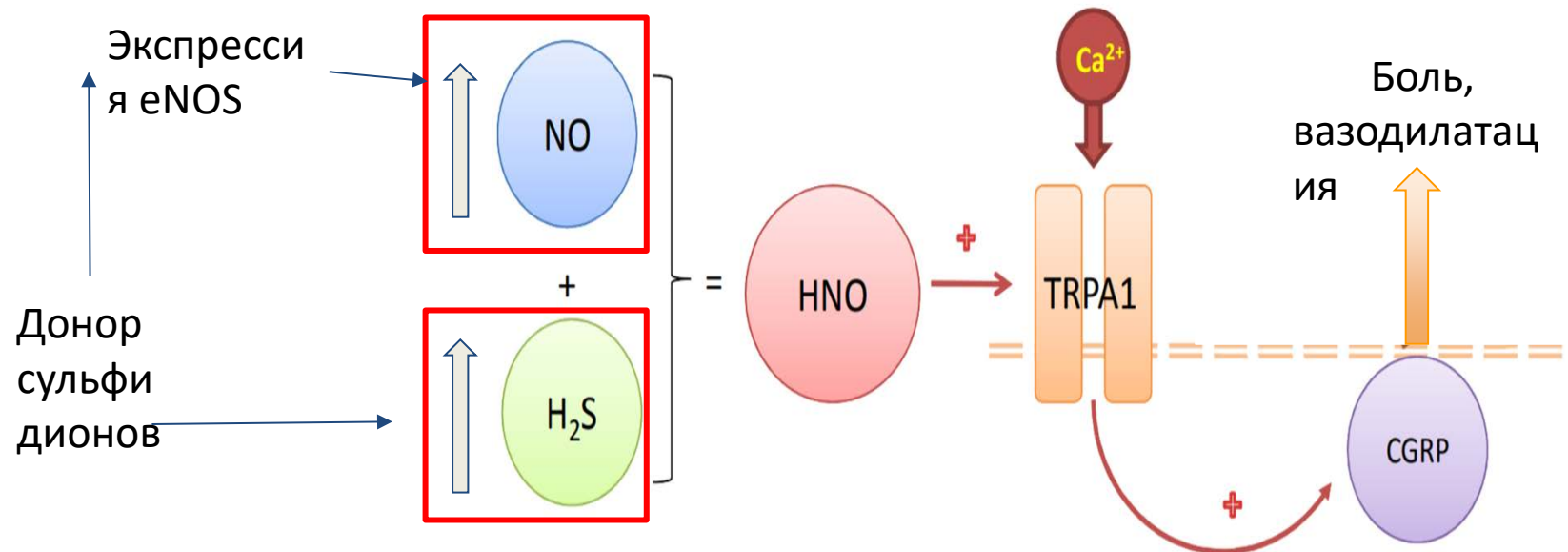
Аллодиния — боль вследствие воздействия раздражителей, обычно её не вызывающих. Аллодинию следует отличать от гипералгезии, то есть повышенной болевой чувствительности на раздражители, обычно вызывающие боль. Статические механические (тактильные) аллодинии - боль в ответ на легкое прикосновение / давление.

Кожная аллодиния, является маркером центральной сенситизации и может быть легко продемонстрирована у пациентов с мигренью. Снижение эффективности терапии триптанами у пациентов с кожной аллодинией предполагает необходимость раннего начала лечения мигрени, до развития центральной сенситизации.



Мы предполагаем, что **введение доноров сульфид-ионов** способно вызывать мигренозоподобные эффекты у мышей.

При этом сульфид-ионы имеют сразу 2 вектора воздействия: прямое повышение концентрации  $H_2S$  и не прямое повышение концентрации NO (Eberhardt et al., 2014), что делает ее потенциально более эффективной.



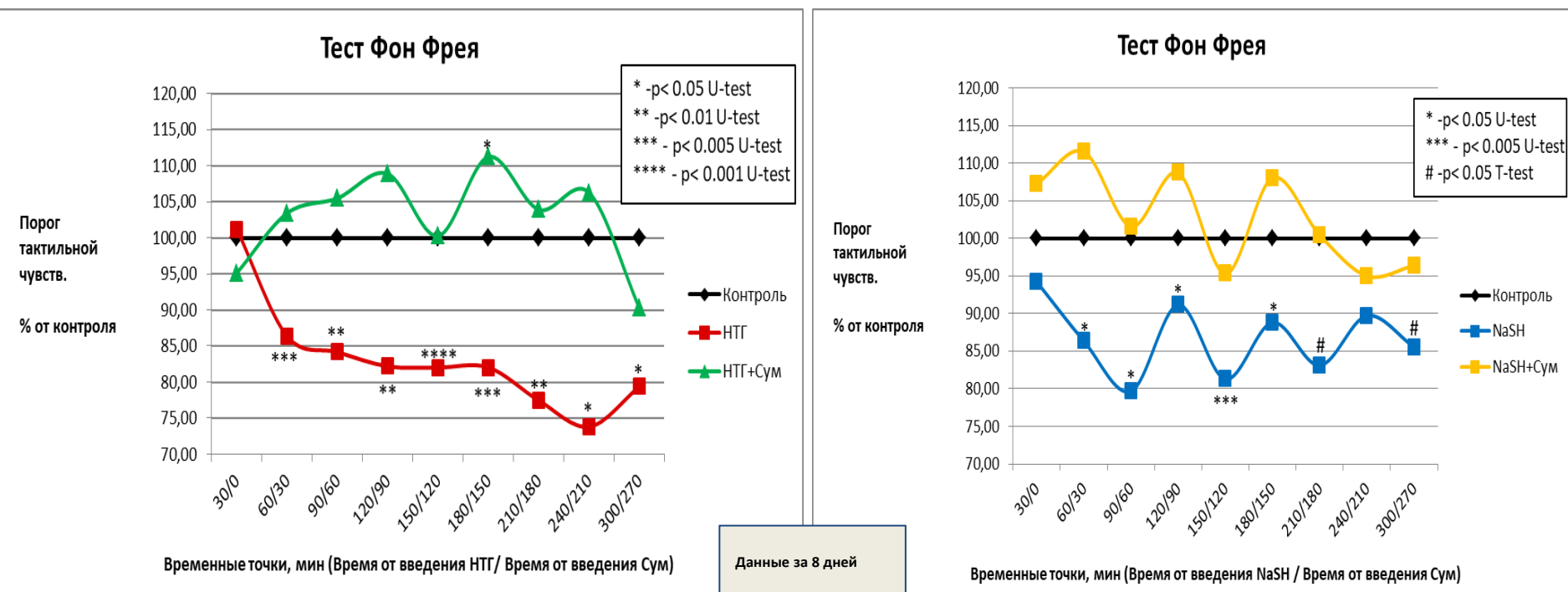
\*eNOS- эндотелиальная NO синтаза III

- Сопоставлены эффективность модели с использованием доноров сульфид-ионов (NaSH) с «нитроглицериновой» моделью.
- Оценка чувствительность модели с использованием доноров сульфид-ионов к суматриптану, сопоставить с «нитроглицериновой» моделью.

NaCl (0,9%, в/б)	NaCl (0,9%, и/н)	Тест Фон-Фрея (1-5 день)
НТГ (10 мг/кг, в/б)	Сум (600 мкг/кг, и/н)	
	NaCl (0,9%, и/н)	
NaSH (10 мг/кг, в/б)	Сум (600 мкг/кг, и/н)	
	NaCl (0,9%, и/н)	

\*в/б – внутрибрюшинное введение, и/н – интраназальное введение.

## НТГ и NaSH вызывают аллодинию



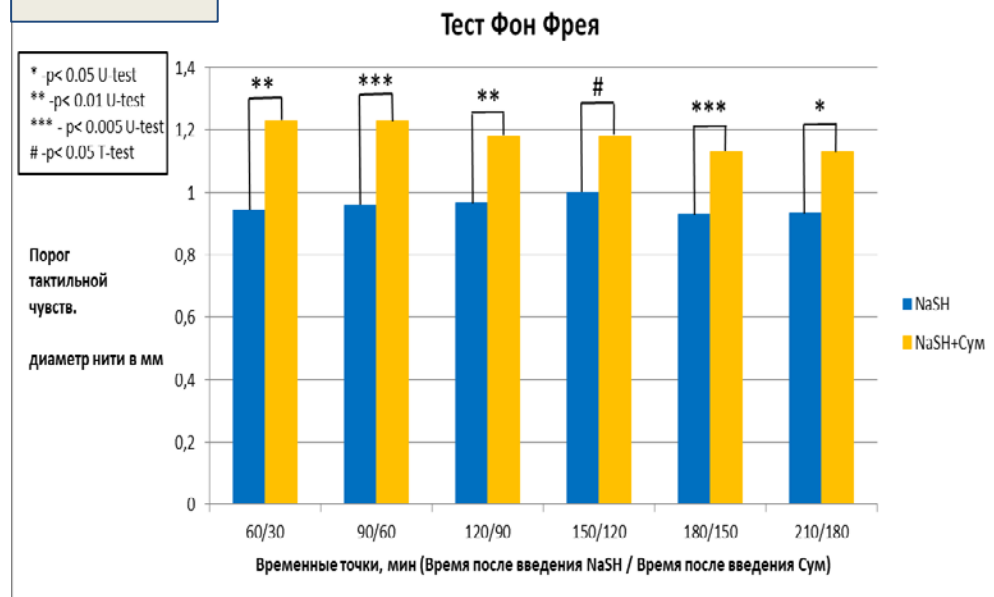
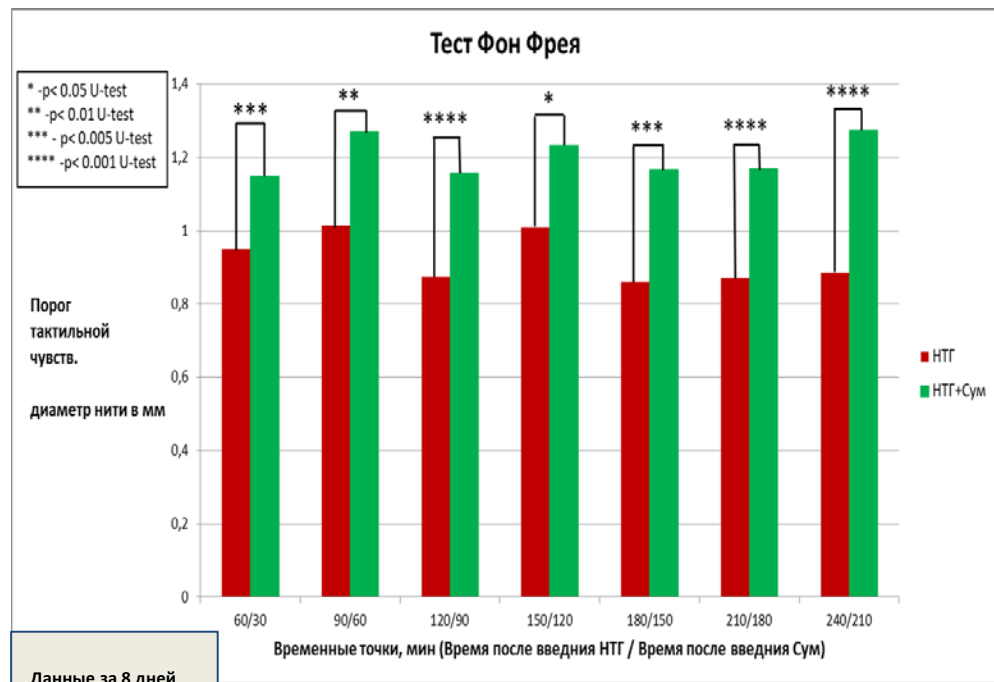
Было выявлено статистически значимое снижение порогов тактильной чувствительности у мышей групп НТГ (от 60 до 300 минут) и NaSH (от 60 до 180 минут). Схожая картина от введения этих двух веществ говорит о состоятельности модели с использованием сульфид-ионов.



## Суматриптан уменьшает аллодинию, вызванную НТГ и NaSH

Нами были обнаружены статистически значимые отличия группы НТГ от группы НТГ+Сум и группы NaSH от группы NaSH+Сум после введения суматриптана в диапазоне от 30 до 210/180 минут. Это говорит о том, что суматриптан уменьшает аллодинию, вызванную НТГ и NaSH.

Таким образом, обе модели (НТГ и NaSH) в сходной степени чувствительны к действию суматриптана, следовательно “сульфатная модель” может использоваться для тестирования противомигренозных препаратов.



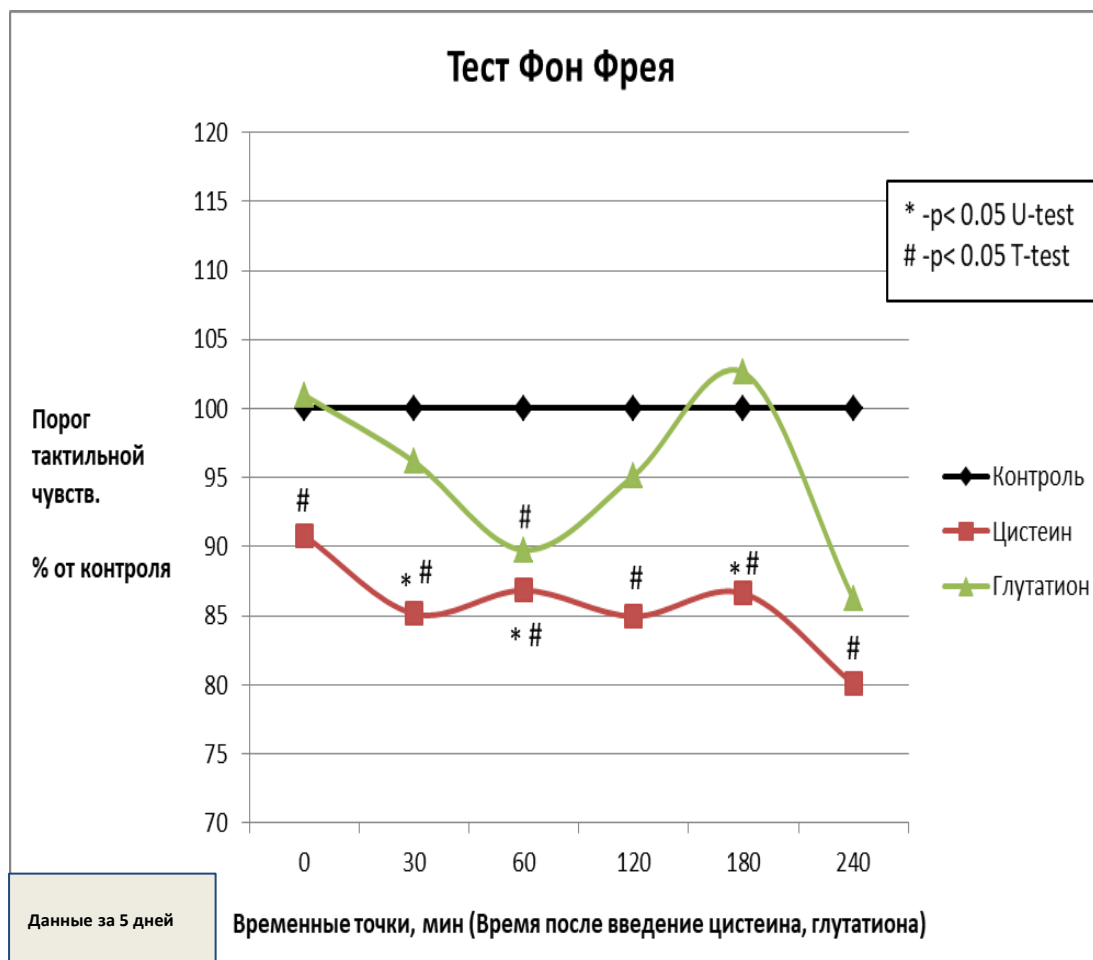
## Серия 2 (10 дней)

- Проверка состоятельность модели с использованием различных доноров сульфид-ионов: NaSH, цистеина и глутатиона. Определить наиболее эффективный донор.

NaCl (0,9%, в/б)	
Цистеин (50 мг/кг, в/б)	Тест Фон Фрея (1-5 день)
Глутатион (50 мг/кг, в/б)	Тест Paw flick (0, 5 день)
Цистеин (100 мг/кг, в/б)	

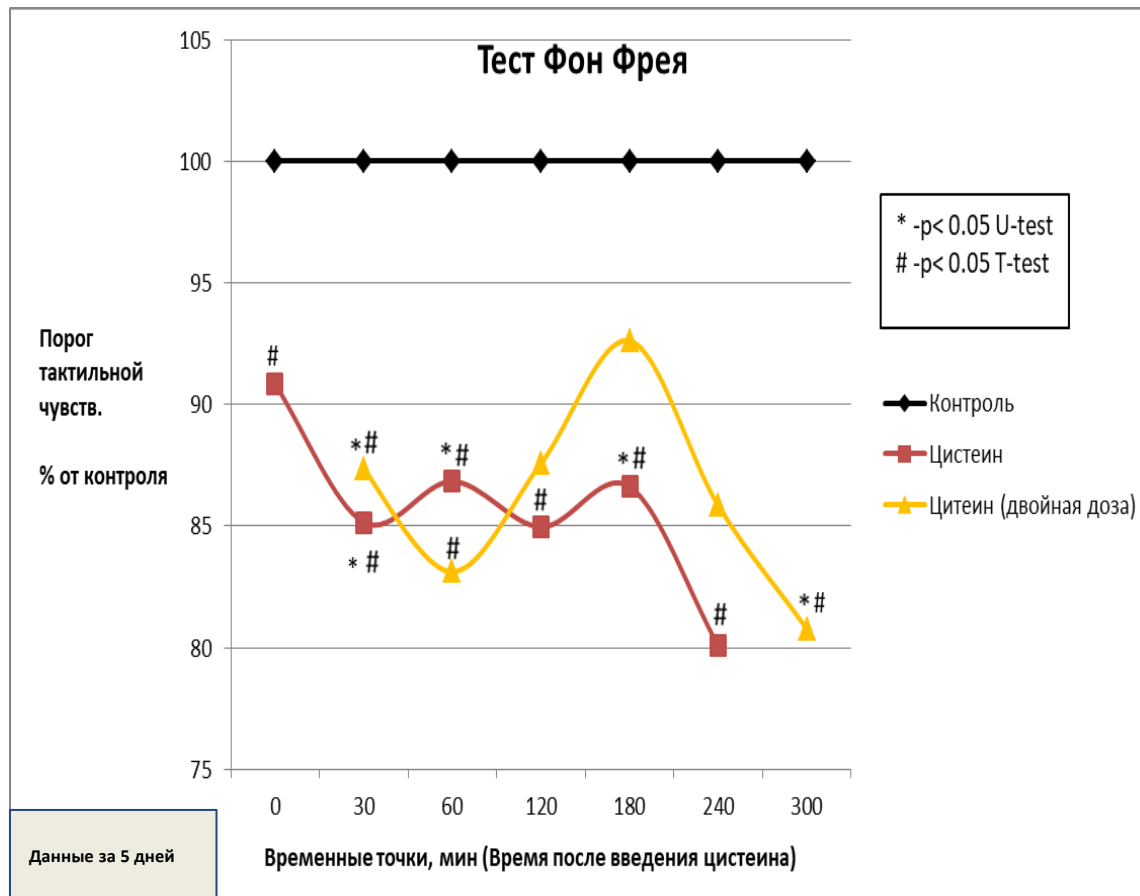
\*в/б – внутрибрюшинное введение, и/н – интраназальное введение.

## Цистеин, но не глутатион, вызывает аллодинию



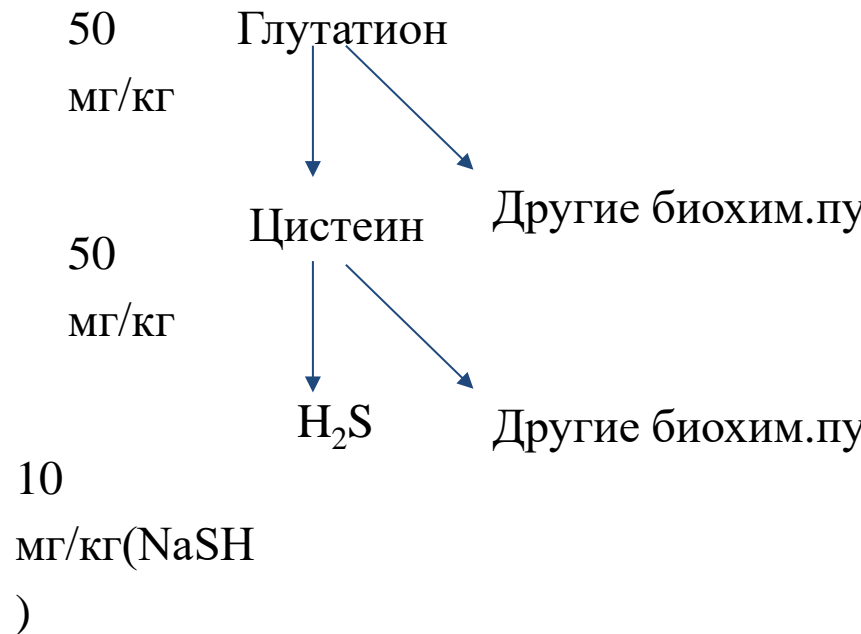
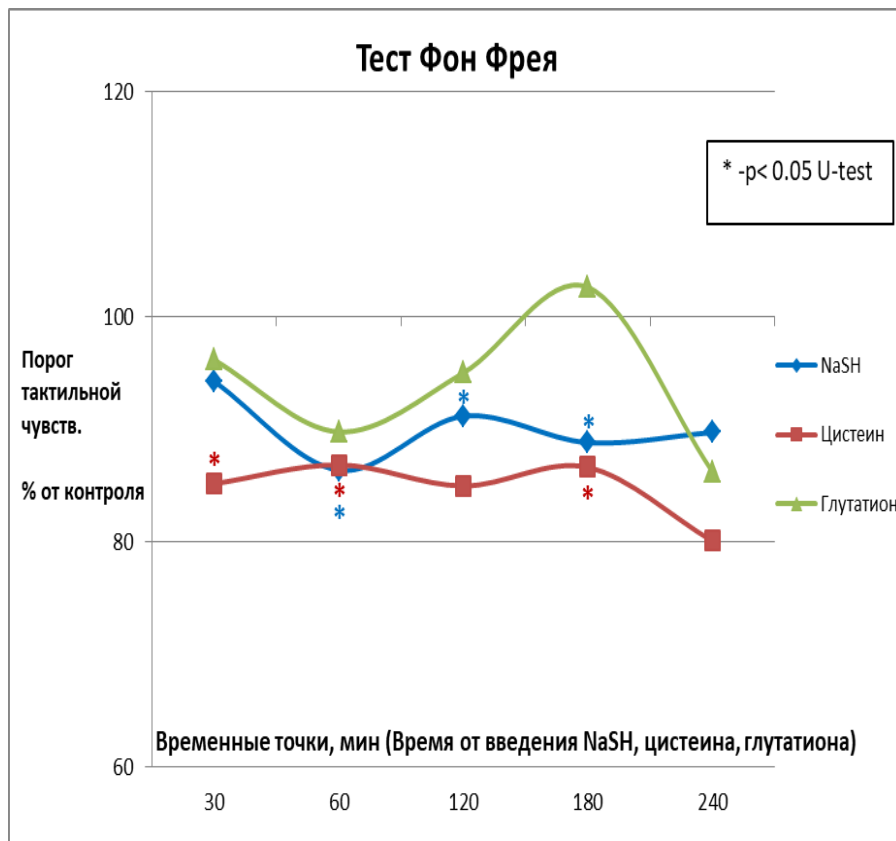
Было обнаружено, что введение цистеина вызывает статистически значимое снижение порогов сенсорной чувствительности. Глутатион не привёл к выраженным изменениям в понижении порогов сенсорной чувствительности.

## Двойная доза цистеина не привела к увеличению аллодинии по сравнению с одинарной дозой



Двойная доза цистеина (100 мг/кг) показала более высокие значения порога сенсорной чувствительности, чем одинарная доза цистеина (50 мг/кг), что говорит о ее меньшей эффективности. Таким образом, оптимальная дозировка цистеина для дальнейших исследований его эффектов на формирование мигрени составляет 50 мг/кг.

## Наиболее эффективный донор сульфид-ионов – NaSH



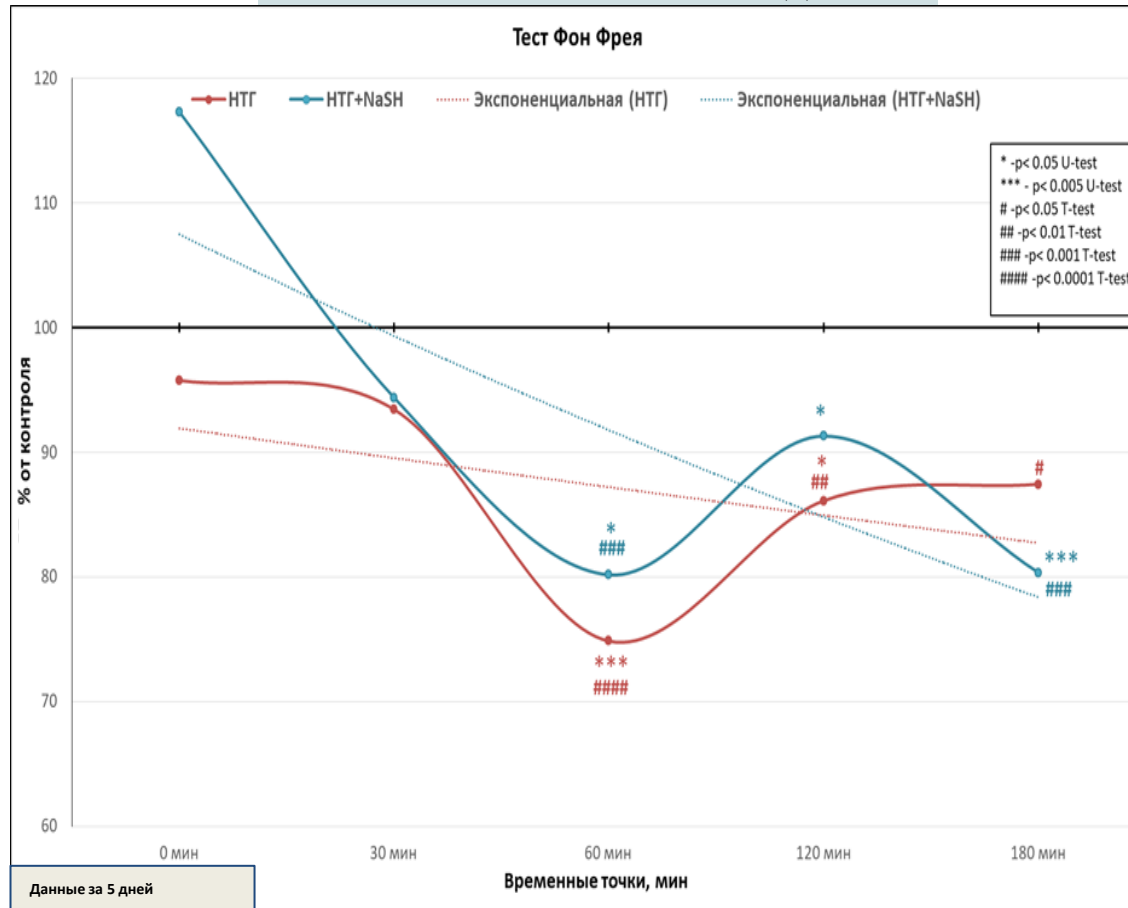
NaSH оказывает эффект в тесте Фон Фрея при наименьшей дозировке (10 мг/кг NaSH против 50 мг/кг цистеина), что делает его наиболее эффективным донором сульфид-ионов.

- Изучение эффекта при совместном введении НТГ и NaSH в дозах, ниже эффективных.

NaCl (0,9%, в/б) + NaCl (0,9%, в/б)	Тест Фон-Фрея (1-5 день) Тест Paw flick (0 и 6 день)
НТГ (10 мг/кг, в/б) + NaCl (0,9%, в/б)	
НТГ (5 мг/кг, в/б) + NaSH (5 мг/кг, в/б)	

\*в/б – внутрибрюшинное введение, и/н – интраназальное введение.

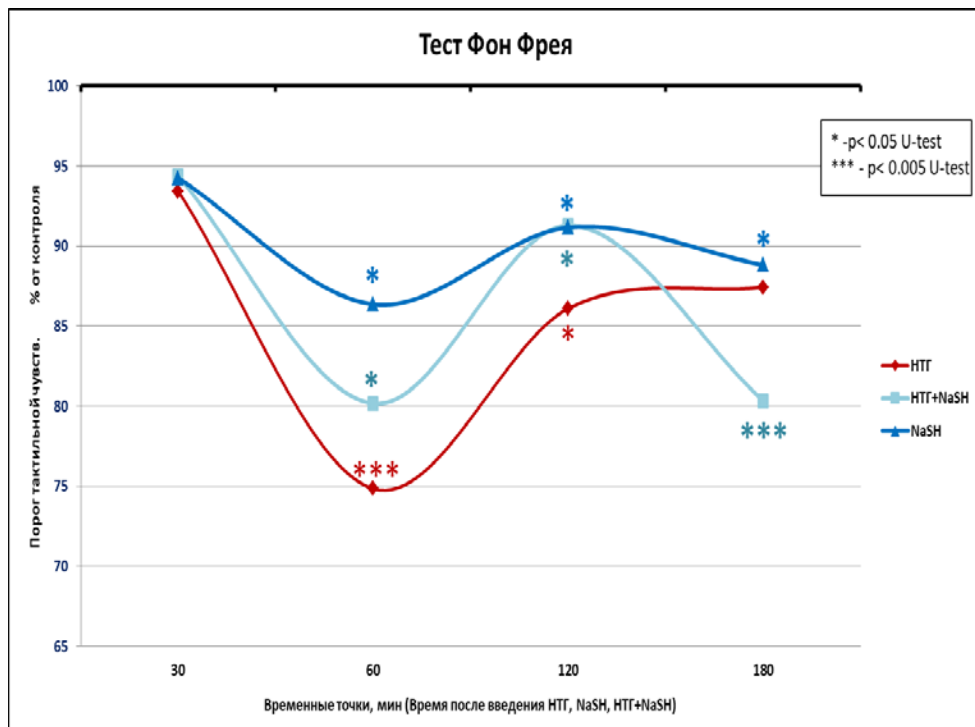
## НТГ+NaSH вызывают аллодинию



Совместное введение НТГ+NaSH показало статистически значимое понижение порогов сенсорной чувствительности во временных точках 60, 120, 180 минут.

При этом минимальное значение порога тактильной чувствительности с максимальной статистической значимостью достигается в точке 180, что говорит об отложенном эффекте от совместного введения.

## НТГ+NaSH оказывают синергический эффект на понижение порогов тактильной чувствительности в точке 180 минут



Концентрации веществ, мг/кг	% Повышения тактильной чувствительности от контроля	
	60 мин	180 мин
<b>(5 мг/кг НТГ + 5 мг/кг NaSH)</b>	<b>20 *</b>	<b>20 ***</b>
10 мг/кг НТГ	25 ***	12,5
10 мг/кг NaSH	14 *	12,5 *
(5 мг/кг НТГ)+(5 мг/кг NaSH) (теоретическая сумма эффектов веществ по отдельности)	19,5	12,5

В точке 60 минут теоретический суммарный эффект от действия веществ по отдельности оказался примерно равным практическому эффекту от совместного действия веществ, в этой точке синергизма не наблюдается.

В точке 180 минут реальный эффект от совместного введения веществ в 2 раза превысил суммарный теоретический эффект от действия веществ по отдельности, что говорит о синергизме в этой точке.