

Антиноцицептивные эффекты витаминов комплекса В

Реферативный перевод

Источник: IBRO Neuroscience Reports 15 (2023) 270–280

Shahab A. Zarei^{a, b}, Mina Shahriari-Khalaji^c, Ian Max Andolina^a, Gila Behzadi^b

^a Центр повышения квалификации в области наук о мозге и интеллектуальных технологий (институт нейробиологии), Китайская академия наук, 320 Yue Yang Road, Шанхай, Китай

^b Кафедра психологии, медицинская школа, медицинский университет им. Шахида Бехешти, Тегеран, Иран

^c Государственная ключевая лаборатория модификации химических волокон и полимерных материалов, колледж наук о материалах и техники, Университет Дунхуа, Шанхай 201620, Китай

1. ВВЕДЕНИЕ

Витамины группы В должны ежедневно поступать с пищей, так как они выполняют важнейшие и разнообразные функции в организме, особенно учитывая, что они не запасаются организмом. Недостаточность этих витаминов может вызвать патофизиологические нарушения, включая эпилепсию, синдром запястного канала, хроническую боль, нарушения сна и аутоиммунные нарушения [1]. В дополнение к восполнению недостаточности в организме, препараты витаминов группы В, по-видимому, оказывают обезболивающее действие в дозах, превышающих ежедневную потребность. Это дает основания предполагать их пользу при лечении патофизиологических нарушений, сопровождающихся болью. С 1950-х гг., когда впервые были получены впечатляющие клинические результаты [2, 3], внимание исследователей сосредоточено на обезболивающих эффектах витаминов В. Противовоспалительные эффекты витаминов В также широко изучались в экспериментах на животных, включая механическую аллодинию и нейропатическую боль [4].

Также полагают, что синергическое действие витаминов В₁, В₆ и В₁₂ (в форме В-комплекса) может эффективнее облегчать боль без риска побочных явлений, даже в высоких дозах. Это причина их широкого применения при клинических нарушениях, сопровождающихся болью. Хотя предлагались различные механизмы для объяснения обезболивающего и противовоспалительного действия витаминов В-комплекса [5–9], число описанных исследований обезболивающих эффектов витаминов комплекса

В мало. В меньшем числе исследований изучалось их влияние на разные аспекты воспалительной болевой реакции, и точный механизм, по которому витамины В снижают боль, остается неизвестным.

Исследование с формалином на грызунах широко применяется для индукции и моделирования острой и хронической воспалительной боли [10, 11]. Сообщалось, что инъекции формалина являются действительной и достоверной моделью, высокочувствительной для исследований различных классов обезболивающих препаратов [12–15].

Процесс болевой сигнализации сложен и включает большое число нейромедиаторов, молекул и химических веществ в организме. Оксид азота (NO), свободно-радикальная диффундирующая молекула газа, которая синтезируется по потребности (в ответ на воспалительную стимуляцию) со временем полувыведения несколько секунд — один из самых важных нейромедиаторов, играющих роль в нейропатической боли в спинном мозге. Она также играет важную роль в направлении и модуляции сигналов, связанных с болью, защите нейронов, нейротоксичности, нейропластичности и устойчивом воспалении [16]. Синтаза оксида азота (NOS) образует NO за счет окисления L-аргинина, предшественника NO, до L-цитруллина. Необходимый восстанавливающий кофактор NADPH для фермента NOS, участвующий в синтезе NO, может использоваться в качестве маркера наличия NO [17]. Многие исследователи сообщают, что ингибирование или «выключение» NOS приводит к устойчивой боли [18].

Экспрессия прото-онкогенного белка *c-Fos*, кодируемого членом семейства немедленно-ранних

генов, является важной нейрофизиологической реакцией на ряд болезненных раздражителей. *c-Fos* быстро индуцируется, контролируя экспрессию других генов, продукты которых участвуют в долговременных изменениях возбудимости нейронов и обнаруживаются иммуногистохимическими методами [19]. Во время ноцицептивной передачи описана Fos-подобная иммунореактивность в дорсальном роге спинного мозга до коры головного мозга, включая нервный каскад передачи сигналов. Таким образом, картирование экспрессии *c-Fos* в областях — это действенный и мощный инструмент отслеживания популяций ноцицептивных нейронов, реагирующих на боль [20, 21].

Учитывая многообещающие результаты, описанные в клинических исследованиях противовоспалительных и обезболивающих эффектов добавок витаминов В-комплекса, в этом исследовании индуцировали у крыс боль, максимально сходную с клинической болью, при помощи формалина. Намеревались определить, изменяет ли Нейробион — комплекс витаминов В — поведенческие проявления боли, и, если это так, установить, в какой фазе (острой и/или хронической) наблюдался какой-либо эффект. Кроме того, хотели разграничить любое такое влияние на NO-продуцирующие нейроны и экспрессию *c-Fos* в дорсальных рогах поясничного отдела спинного мозга, а также супраспинальных центрах, участвующих в обработке болевой информации.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Животные и лечение

В этом исследовании использовались самцы крыс Вистар со средним весом 195 ± 15 г в качестве модельных животных. Исследования на животных полностью соответствовали принципам и протоколам работы с животными и экспериментам, руководствам по уходу за животными, установленными Международной ассоциацией исследований боли (IASP) и в соответствии с NIH и рекомендациями комиссии по этике нашего института для исследований на животных.

Крыс делили на три группы, по 8 крыс в каждой ($n = 8$); количество выбрали на основании ранее опубликованных исследований [22–25]. Для наблюдений за поведением и гистохимической оценки из каждой группы произвольно выбирали по шесть и четыре крысы, соответственно. В первой экспериментальной группе животным вводили 50 мкл формалина подкожно в плантарную поверхность правой задней лапы иглой № 30, в концентрации 5 %, как использовалось ранее [26, 27], в качестве нашей контрольной группы (КГ). Для клинического лечения острой или хронической боли Нейробион обычно применяют внутрь или внутримышечно

(более высокая биодоступность) 7–10 дней подряд [28]. Мы выбрали 10-дневное внутривнутрибрюшинное (в/б) введение Нейробиона в более высокой дозе на основании клинической литературы [29, 30]. Нейробион, используемый в этом исследовании, был получен из общедоступного источника и аналогичен назначаемому в лечебных учреждениях, чтобы максимально близко воспроизвести клинические условия, так как было важно использовать препарат, типичный для клинической практики и доступный пациентам. Второй группе предварительно вводили препарат НЕЙРОБИОН в форме инъекций в дозе 1 мл/кг веса тела [1 мл содержит 33,3 мг В₁, 33,3 мг В₆ и 0,333 мг В₁₂]. Инъекции продолжали 10 дней, а затем делали инъекции формалина (опытная группа (ОГ)) в последний день (через час после последней инъекции Нейробиона) с использованием того же протокола, что и в группе 1. Чтобы оценить эффект боли или стресса после только внутривнутрибрюшинной (в/б) инъекции, мы добавили третью группу (получавшую носитель), которую акклиматизировали и содержали так же, как группу 2, но вводили внутривнутрибрюшинно физиологический раствор ежедневно и в последний раз за час до инъекции формалина.

2.2. Измерение выраженности боли (оценка боли)

Инъекция формалина в плантарную область задней лапы крыс вызывает воспаление, что позволяет оценить реакцию животных на боль в острой и хронической фазе. Исследователи предполагают, что исследование с формалином, по сравнению с термическими и механическими моделями боли, является одной из наиболее достоверных моделей для оценки клинической боли [31], и позволяет нам определять острую и хроническую фазу, на которых Нейробион оказывает свое действие. Вводили формалин путем инъекции и тщательно наблюдали за поведением, характерным для боли (оценка боли) в течение часа, записывая оценки каждые 15 сек. Поведение крыс оценивали по соответствующим количественным критериям поведенческих проявлений боли [32]: присваивали 0 баллов, если поведение, характерное для боли, отсутствовало, и крыса не обращала внимания на лапу, в которую сделана инъекция; оценку 1 присваивали, когда крыса передвигалась или стояла, опиралась преимущественно на конечности, в которые не делали инъекцию; оценку 2 использовали, когда крыса поднимала конечность, в которую сделана инъекция; оценку 3 использовали, когда крыса трясла или лизала конечность, в которую сделана инъекция. Для оценки интенсивности боли тщательно оценивали время, в течение которого животное вздрагивает или вылизывает конечность, на протяжении часа, делая записи каждые 5 минут.

2.3. Взятие образцов ткани спинного и головного мозга

Для гистохимического исследования из каждой группы произвольно выбирали четырех крыс после завершения наблюдения за поведением. Ткани спинного и головного мозга фиксировали точно через 2 ч после инъекции формалина (через час после окончания часового наблюдения за поведением). Для изготовления тонких срезов замороженных тканей 40 мкм использовали замораживающий криостат-микротом (Leica, Германия), срезы поясничного отдела спинного мозга и головного мозга хранили в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) при 4 °С.

2.4. Гистохимический и иммуногистохимический анализ

Для гистохимического окрашивания на NADPH-диафорузу (NADPH-d) срезы поясничного отдела спинного мозга и ствола головного мозга выдерживали при комнатной температуре и трижды промывали ФСБ с добавлением тритона X-100 (0,1 %), после чего инкубировали в ФСБ (0,1 М) с добавлением тритона X-100 (0,3 %), p-NADPH (0,1 мг/мл) и нитросинего тетразолия (НСТ) (0,1 мг/мл) с защитой от света при 37 °С в течение 1 ч до появления пурпурного окрашивания. После завершения реакции срезы извлекали и трижды промывали ФСБ и деионизированной водой, а затем изготавливали препараты на предметных стеклах с использованием экспресс-набора для изготовления гистологических препаратов Entellan (Merck, Германия), высушивали на воздухе и накрывали покровными стеклами.

Другие срезы поясничного отдела спинного мозга и ствола головного мозга окрашивали на *c-Fos* иммуногистохимическим методом.

2.5. Статистический анализ

Все данные выражены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Результаты в опытной группе представляли визуально с помощью графиков типа «дождевого облака» [33], а для анализа использовали JASP V0.16.3 [34].

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты этого исследования разделены на две части: наблюдения за поведением и гистологическое исследование. При наблюдении за поведением индуцировали боль с помощью формалина и выполняли количественные измерения частоты и длительности вылизывания и вздрагивания (вместе с полученными оценками боли), которые сравнивали между КГ и ОГ. Крыс для гистологического исследования выбирали произвольно после наблюдений за поведением. Из-

менения в путях головного мозга оценивали по реактивности NADPH-d и *c-Fos*, от поясничного отдела спинного мозга до супраспинальных структур, которые участвуют в обработке болевой информации.

3.1. Наблюдения за поведением и количественная оценка

После инъекции формалина в исследовании наблюдались четкие двухфазные поведенческие проявления боли. Первая фаза (фаза I) известна как острая фаза и включает первые пять минут после инъекции. Вторая фаза (фаза II) начинается вскоре после фазы I и длится дольше, через 10–35 минут. Эти две фазы разделены интерфазой (время между 5 и 10 минутами). Боль уменьшается во время фазы восстановления, которая продолжается примерно с 35 до 60 минуты (рис. 1).

Оценки поведения в КГ и группе, в которой предварительно вводили Нейробион (ОГ) на протяжении четырех периодов показаны на рис. 1. 2-сторонний дисперсионный анализ показал значимое и крупное различие между КГ и ОГ ($F(1, 32) = 33,22$, $p < 0,001$; величина эффекта ($\omega^2 = 0,19$), значимое и крупное различие между периодами времени ($F(3, 32) = 26,58$, $p < 0,001$; величина эффекта ($\omega^2 = 0,46$), и значимое и средней величины взаимодействие ($F(3, 32) = 4,72$, $p = 0,006$; величина эффекта ($\omega^2 = 0,07$). Простой анализ основных эффектов показал значимые различия между ОГ и КГ для фазы 1 ($p = 0,025$), интерфазы ($p < 0,001$) и фазы 2 ($p < 0,001$); но без значимых различий в восстановлении ($p = 0,930$). Апостериорные множественные групповые сравнения подтвердили высоко значимые различия между КГ и ОГ только для интерфазы и фазы 2 (рис. 2а; $p < 0,001$ и $p = 0,005$ соответственно).

Наблюдалось снижение соответствующих компонентов поведенческой реакции на всех фазах как для времени вылизывания, так и для частоты вылизывания; они достигли значимости во время интерфазы (*время вылизывания*: $p = 0,046$ Т-критерий Стьюдента, d Коэна = 0,85) и второй фазы (*время вылизывания*: $p = 0,014$ Т-критерий Стьюдента, d Коэна = $1,72 \pm 0,76$; *частота вылизывания*: $p = 0,04$ Т-критерий Стьюдента, d Коэна = $1,36 \pm 0,7$) для ОГ в сравнении с КГ (рис. 2b и c). На рис. 2 d и e показаны графики времени и частоты вздрагивания, четко показывающие значимое снижение в ОГ как во время интерфазы (*время вздрагивания*: $p = 0,003$ Т-критерий Уэлча, d Коэна = $2,94 \pm 1,03$; *частота вздрагивания*: $p = 0,004$ Т-критерий Уэлча; d Коэна = $2,57 \pm 0,94$) и второй фазы (*время вздрагивания*: $p = 4,3 \times 10^{-4}$ Т-критерий Стьюдента, d Коэна = $2,97 \pm 1,03$; *частота вздрагивания*: $p = 0,026$ Т-критерий Уэлча, d Коэна = $1,57 \pm 0,73$).

Таким образом, Нейробион приводил к значительному снижению боли на второй фазе и в интер-

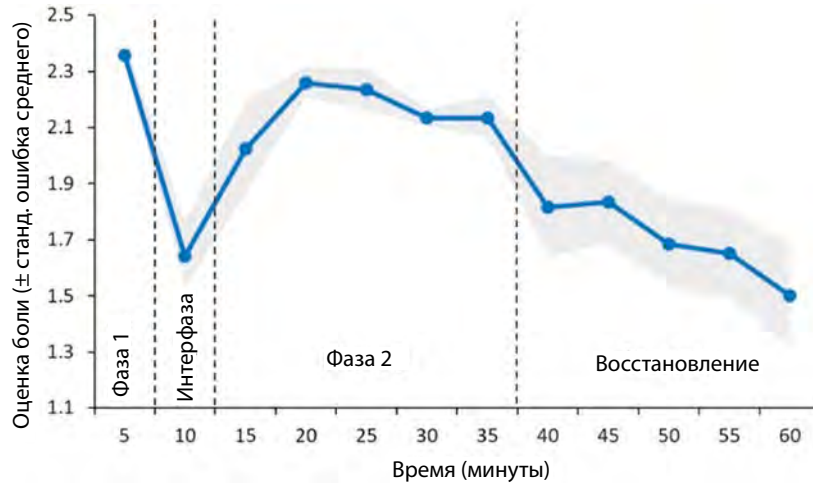


Рис. 1. Разные фазы болевой реакции во время исследования с формалином. Первая фаза, интерфаза, вторая фаза и время восстановления в оценке боли в контрольной группе (n = 6). Серая полоса на рисунке обозначает ± стандартная ошибка среднего для оценок боли.

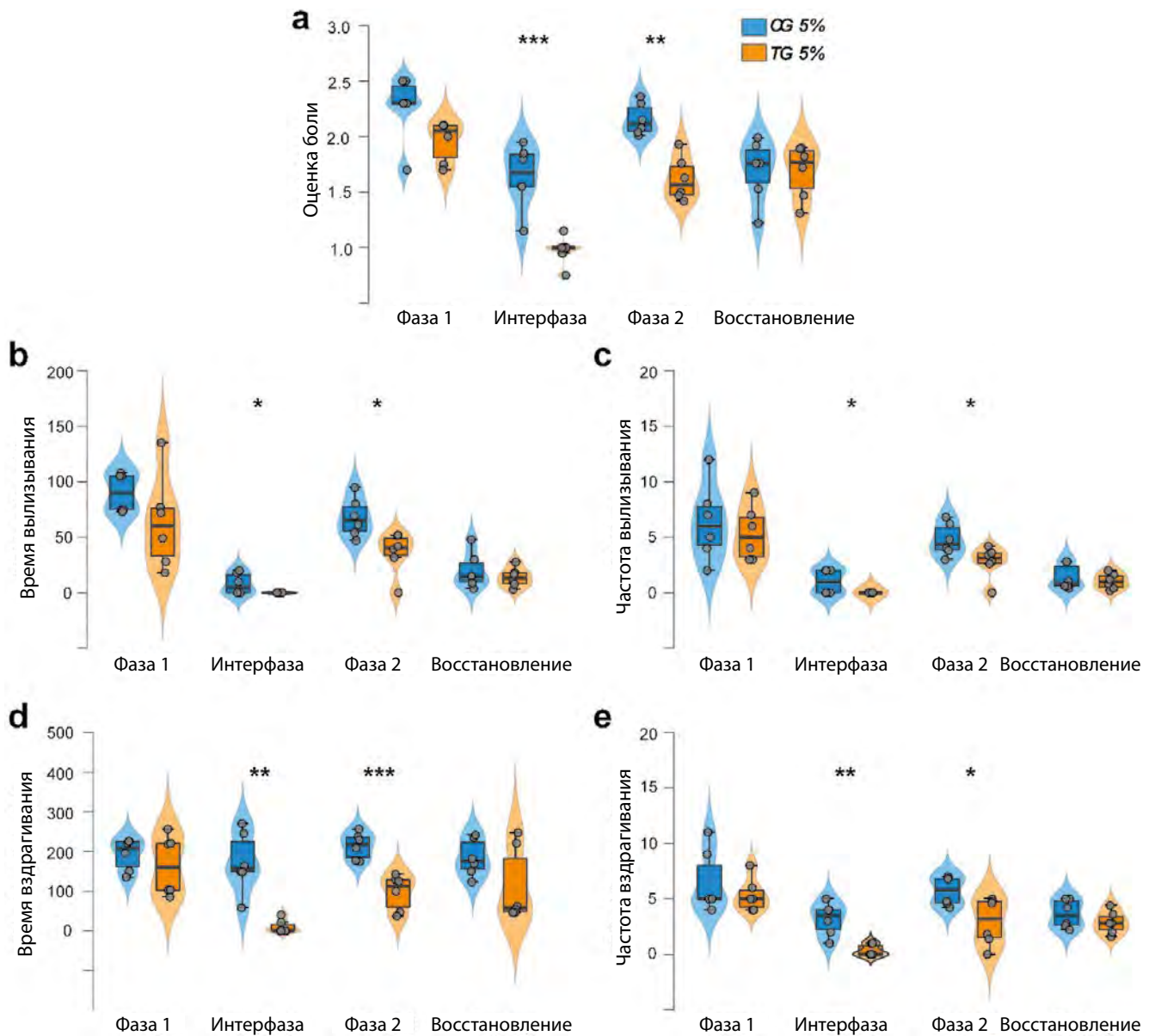


Рис. 2. График распределения при сравнении оценок поведения, характерного для боли, между группой, получавшей Нейробион (ОГ) и контрольной группой (КГ) в исследовании с формалином. Значимое снижение наиболее четко видно в составной оценке боли (а) и поведенческих реакций (b — d) в интерфазу и фазу 2 (n = 6, *P < 0,05, **P < 0,01 и ***P < 0,001).

фазе, но не в первой фазе и в период восстановления, что указывает на максимальный эффект Нейробиона во время хронической фазы болевой реакции.

3.2. Гистохимический анализ

Для гистохимического и иммуногистохимического исследования мы использовали не менее 20 срезов спинного мозга (основная область интереса L4 и L5 поясничной области) и получали пять срезов из каждой области интереса в супраспинальной области каждой крысы.

Для оценки NADPH-d-положительных нейронов в этом исследовании мы изучили область дорсального рога, содержащую пластины от I до IV, а также вокруг центрального канала, включая пластину X. Пластины I–II как поверхностные пластины дорсального рога и пластины III–IV как глубокие пластины исследовали отдельно.

3.2.1. КОЛИЧЕСТВО NADPH-D-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ В СПИННОМ МОЗГЕ

В поверхностных пластинках дорсального рога мелкие аксоны имели веретенообразную форму и отростки, проецирующиеся на короткое расстояние вокруг нейронов. В глубоких пластинках дорсального рога наблюдались более крупные нейроны с мультиполярными телами, и их отростки разветвлялись во всех направлениях. Выросты некоторых из этих нейронов также достигают поверхностных пластин. После инъекций формалина исследовали количество NADPH-d-положительных нейронов в поверхностных и глубоких пластинках дорсального рога в КГ и сравнивали с ОГ со стороны инъекции и противоположной стороны. После инъекции формалина количество NADPH-d-положительных нейронов в пластинках дорсального рога спинного мозга в ОГ, особенно в поверхностных пластинках (I–II), было значительно ниже, чем в КГ, с обеих сторон.

В поверхностных пластинках (I и II) мы наблюдали снижение на 25 % (CO = 0,4) количества NADPH-d-положительных нейронов со стороны инъекции (пластины I–II IPSI, $p < 0,001$, Т-критерий Стьюдента; величина эффекта $1,05 \pm 0,3$). Среднее число нейронов в месте инъекции было $7,1 \pm 0,3$ (среднее \pm стандартная ошибка среднего) в КГ и $5,2 \pm 0,3$ в ОГ. С противоположной от инъекции стороны (CONTRA I + II) мы наблюдали снижение на 15 % (CO = 0,6) количества нейронов ($p < 0,001$, U-критерий Манна-Уитни; величина эффекта $0,30 \pm 0,7$). Среднее число нейронов на противоположной стороне было $7,5 \pm 0,3$ в КГ и $5,1 \pm 0,4$ в ОГ.

В глубоких пластинках (III и IV) мы наблюдали снижение на 34 % (CO = 0,4) количества нейронов со стороны инъекции (пластины III + IV IPSI, $p < 0,013$, U-критерий

Манна-Уитни; величина эффекта $0,37 \pm 0,1$). Среднее число нейронов на стороне инъекции было $2,7 \pm 0,1$ в КГ и $2,0 \pm 0,2$ в ОГ. Однако не было обнаружено значимых различий в количестве нейронов с противоположной стороны (CONTRA III + IV, $p = 0,38$, U-критерий Манна-Уитни). Среднее число нейронов на противоположной стороне было $1,8 \pm 0,2$ в КГ и $2,2 \pm 0,3$ в ОГ.

3.2.2. КОЛИЧЕСТВО NADPH-D-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ В ПЛАСТИНЕ X

NADPH-d-положительные нейроны в пластине X имеют более крупные тела и ряд морфологий. Обнаружено, что некоторые нейронные отростки достигают дорсального рога

Вокруг центрального канала (пластина X) число NADPH-d-положительных нейронов в верхней четверти области инъекции (с синапсами на той же стороне, что дорсальный рог) показано значительное ($p = 0,016$, критерий Манна-Уитни) снижение числа NADPH-d-положительных нейронов в ОГ по сравнению с КГ. В КГ среднее число NADPH-d-положительных нейронов составило $3,8 \pm 0,2$ (среднее \pm стандартная ошибка среднего). В противоположность этому, в ОГ показано меньшее среднее число NADPH-d-положительных нейронов, со значением $2,9 \pm 0,2$ (среднее \pm стандартная ошибка среднего).

3.2.3. КОЛИЧЕСТВО NADPH-D-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ В СУПРАСПИНАЛЬНЫХ ОБЛАСТЯХ

Гистохимический анализ в этом исследовании был сосредоточен на таких областях, как околоспинальное серое вещество, парабрахиальное ядро и латеродорсальное тегментальное ядро (ЛДТЯ). Однако учитывая высокую плотность нейронов в этих областях и множественные слои, точный подсчет с помощью камеры-люциды было сложно реализовать, и визуальное наблюдение не выявило изменений со стороны инъекции по сравнению с противоположной стороной, а также в ОГ в сравнении с КГ

3.3. Иммуногистохимическая реакция на белок c-Fos

Также исследовалась иммуногистохимическая реакция на белок c-Fos в поясничной области дорсального спинного мозга и супраспинальных центров в ответ на воспалительную боль, вызванную формалином. Результаты показали, что c-Fos-положительные нейроны в дорсальном спинном мозге в ОГ и КГ наблюдались только со стороны инъекции. В поверхностных пластинках (I–II) было обнаружено высокосignificantное снижение числа c-Fos-положительных нейронов в ОГ по сравнению с КГ ($p = 5,03 \times 10^{-7}$, Т-критерий Стьюдента; величина эффекта $0,78 \pm 0,16$).

В частности, среднее количество *c-Fos* — положительных нейронов в пластинках (I–II) в ОГ составило $35,3 \pm 1,0$, тогда как среднее количество в ОГ было $43,8 \pm 1,0$ (среднее \pm стандартная ошибка среднего).

4. ОБСУЖДЕНИЕ

В этом исследовании изучалось влияние длительного применения препарата Нейробион на воспалительную боль при помощи поведенческих и морфологических методов. Это первое исследование по изучению витаминов группы В, в котором применяется NADPH-d и *c-Fos* для оценки роли NO в болевом пути дорсального рога спинного мозга и супраспинальных центров.

Было показано, что предварительное введение Нейробиона приводило к четкому и значимому снижению поведенческих реакций на боль в хронической фазе. Результат согласуется с исследованиями, в которых сообщается, что длительное предварительное применение витаминов В-комплекса может снизить поведенческие проявления боли, такие как время вылизывания [35] и оценки вздрагивания [36] в ответ на боль, вызванную инъекцией формалина.

Обезболивающие эффекты В-комплекса могут быть опосредованы различными механизмами. Один возможный механизм — модуляция систем нейромедиаторов, участвующих в обработке болевой информации. Витамины В, такие как В₆ и В₁₂, играют важные роли в синтезе и метаболизме нейромедиаторов, включая серотонин, норадреналин и гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК). Эти нейромедиаторы участвуют в модуляции боли, и изменения в уровне их активности могут повлиять на восприятие боли. Следовательно, добавка В-комплекса может восстановить или улучшить функционирование этих систем нейромедиаторов, приведя к уменьшению болевых реакций.

Кроме того, сообщается, что витамины В-комплекса обладают противовоспалительными свойствами. Воспаление играет решающую роль в развитии и поддержании боли и снижение воспалительной реакции может облегчить симптомы боли. Показано, что витамины В, такие как витамин В₃ (ниацинамид), оказывают противовоспалительное действие за счет подавления выработки про-воспалительных цитокинов и модуляции активности иммунных клеток [37]. Следовательно, представляется правдоподобным, что противовоспалительное действие витаминов В-комплекса способствует его обезболивающим свойствам при боли, индуцированной формалином.

Кроме поведенческих реакций, важно учитывать нейронные корреляты наблюдаемого обезболивающего эффекта. Предыдущие исследования показали, что боль, вызванная формалином, связана с активацией

определенных нейронов, которые, как полагают, играют роль в передаче и модуляции боли.

Наши результаты показали, что инъекция формалина в правую лапу крыс может увеличить количество NADPH-d-положительных нейронов с обеих сторон дорсального рога на уровне поясничного отдела спинного мозга, а также в X пластине. Это наблюдение согласуется с предыдущими исследованиями, подчеркивая участие NADPH-d-положительных нейронов в обработке боли [38, 39]. Кроме того, подробно описана регулирующая функция витаминов В в синтезе нейроактивных веществ; они играют решающую роль в регуляции различных нейроактивных веществ, включая оксид азота (NO) [40]. Интересно, что после инъекции формалина в группу, получавшей Нейробион, количество NADPH-d-положительных нейронов с обеих сторон поверхностных пластин в дорсальных рогах значительно уменьшилось по сравнению с контрольной группой. Эту же картину наблюдали в области вокруг центрального канала. Эти данные дают основания полагать, что Нейробион, содержащий необходимые витамины В, может модулировать синтез или высвобождение нейроактивных веществ, участвующих в обработке болевых импульсов, таких как NO.

Исследования показали, что нейроны, содержащие NOS в этих пластинках, фактически являются спиноталамическими проекциями, участвующими в обработке боли спинным мозгом, и описана двухсторонняя активация этих нейронов в спинном мозге после воспаления, вызванного инъекцией формалина [41] или каррагена [42] в лапу крыс.

Учитывая снижение поведенческих проявлений боли вместе со снижением количества NADPH-d-положительных нейронов в поверхностных пластинках дорсального рога и пластине X, обоснованно полагать, что снижение боли связано с изменениями в передаче нервных импульсов, опосредованной NO. Эту точку зрения поддерживает то, что после инъекции формалина в заднюю конечность крыс число нейронов, экспрессирующих nNOS (нейронную синтазу оксида азота), в поясничном отделе спинного мозга повышается [42], а также то, что блокирование NOS под действием метилового эфира L-NG-нитроаргина (L-NAME) снижает эффект витаминов В; это дает основания полагать, что обезболивающее действие витаминов В в некоторой степени обусловлено высвобождением NO [36].

Также показано, что стимуляция первичных чувствительных нейронов различными болевыми раздражителями быстро вызывает экспрессию белка *c-Fos* в ядрах постсинаптических нейронов в поверхностных слоях дорсального рога спинного мозга с одной стороны, что используется в качестве кос-

венного маркера нейронной активности при определении путей боли.

В некоторых исследованиях изучалась зависимость между Fos-/ NADPH-d-положительными нейронами и поведенческими проявлениями боли в условиях боли, индуцированной формалином. Исследователи наблюдали положительную корреляцию между количеством Fos-/ NADPH-d-положительных нейронов и поведенческими проявлениями боли, такими как вылизывание или вздрагивание, что дает основания предполагать потенциальное участие этих нейронов в передаче или модулировании боли [43, 44].

Сообщалось, что характер распределения и активации Fos-/ NADPH-d-положительных нейронов во время острой и хронической фаз боли различается [21]. Во время острой фазы Fos-/ NADPH-d-положительные нейроны наблюдались преимущественно в зонах, связанных с передачей болевых импульсов, что указывает на их участие в немедленной реакции на боль. В противоположность этому, во время хронической фазы Fos-/ NADPH-d-положительные нейроны были распространены шире, включая области, связанные с модуляцией боли, что указывает на их потенциальную роль в долговременной обработке и модуляции боли. Эти данные подчеркивают важность исследования взаимоотношений между Fos-/ NADPH-d-положительными нейронами, поведенческими проявлениями боли и болевыми путями в контексте боли, индуцированной формалином. Характер активации и распределения этих нейронов дают ценную информацию о нейронных механизмах, лежащих в основе восприятия и модуляции боли.

Характер экспрессии *c-Fos* при висцеральной стимуляции также отличается от наблюдаемого при соматической стимуляции, что проявляется двусторонне [45]. Экспрессию *c-Fos* после стимуляции нейронов болевых рецепторов в спинном мозге можно остановить обезболивающими или болеутоляющими средствами, такими как морфин, индометацин [46] и кетопрофен [47] перед инъекцией каррагенана. Каждая из этих демонстраций подтверждает взаимосвязь между экспрессией *c-Fos* и болью. В настоящем исследовании также наблюдали значительное снижение количества *c-Fos*-положительных нейронов в задних пластинках спинного мозга в группе, получавшей Нейробион (ОГ), по сравнению с КГ. Однако исследования показали, что *c-Fos* по-прежнему экспрессируется после анестезии, которая уменьшает боль или болевые реакции. Сообщалось, что после облегчения боли экспрессия *c-Fos* все еще высокая, что указывает на сохранение чувствительности клеток, экспрессирующих *c-Fos*, и существуют теории, что экспрессия *c-Fos* отражает центральную чувствительность.

Судя по результатам предыдущих работ в совокупности с данными настоящего исследования, наблюдаемое снижение экспрессии *c-Fos* в дорсальных частях спинного мозга после предварительного введения Нейробиона, в сочетании с его усиленной экспрессией, совпадающей с показателями боли, говорит о потенциальном участии *c-Fos* в индукции боли, что согласуется с опубликованными данными. Кроме того, эти результаты дают основания полагать, что Нейробион может оказывать обезболивающее действие по механизмам, сходным с механизмами действия NO-блокирующих обезболивающих препаратов при гипералгезии или боли. За счет снижения количества активных нейронов, использующих NO в качестве нейромедиатора, Нейробион потенциально может способствовать уменьшению боли. Эти данные говорят о потенциале Нейробиона в качестве дополнительного средства к обезболивающим препаратам для более эффективного облегчения боли, либо в качестве самостоятельного препарата для облегчения боли.

Некоторые исследования также дают основания полагать, что обезболивающее действие некоторых болеутоляющих препаратов обусловлено активацией нисходящих тормозных путей. Недавнее исследование [48] показало, что высокие концентрации NO в дорсолатеральном околоспинальном сером веществе (длОВСВ) могут регулировать процесс восприятия боли посредством нисходящих синаптических взаимодействий. Участие NO как в дорсальном гиппокампе (дГ), так и в веществе длОВСВ наблюдалось при морфиновом обезболивании во время исследования с формалином на крысах. Инъекция L-аргинина снижала ответ на морфин на обеих стадиях, тогда как введение L-NAME, ингибитора nNOS, не оказывало действия. Однако при инъекции L-NAME в длОВСВ перед L-аргинином в дГ ответ на морфин восстанавливался на ранних стадиях, указывая, что на модуляцию NO в пути боли от дГ до длОВСВ. В другом исследовании, в котором использовался формалин и затем оценивался эффект инъекции энкефалина в желудочек мозга, показано снижение оценки боли, а экспрессия *c-Fos* в пластинках, связанных с обработкой боли в спинном мозге, подавлялась [21]. Этот эксперимент дает веское доказательство теории, что супраспинальные опиоиды уменьшают боль за счет активации нисходящего тормозящего контроля. В частности, активация нейронов ОВСВ стимулирует нейроны в ядрах шва, которые образуют синапсы с чувствительными нейронами в спинном мозге и тормозят их. Это исследование дает основания полагать, что нисходящий тормозной механизм (который подавляет возбуждение нейронов в ответ на боль), действующий на уровне спинного мозга, необходим для реализа-

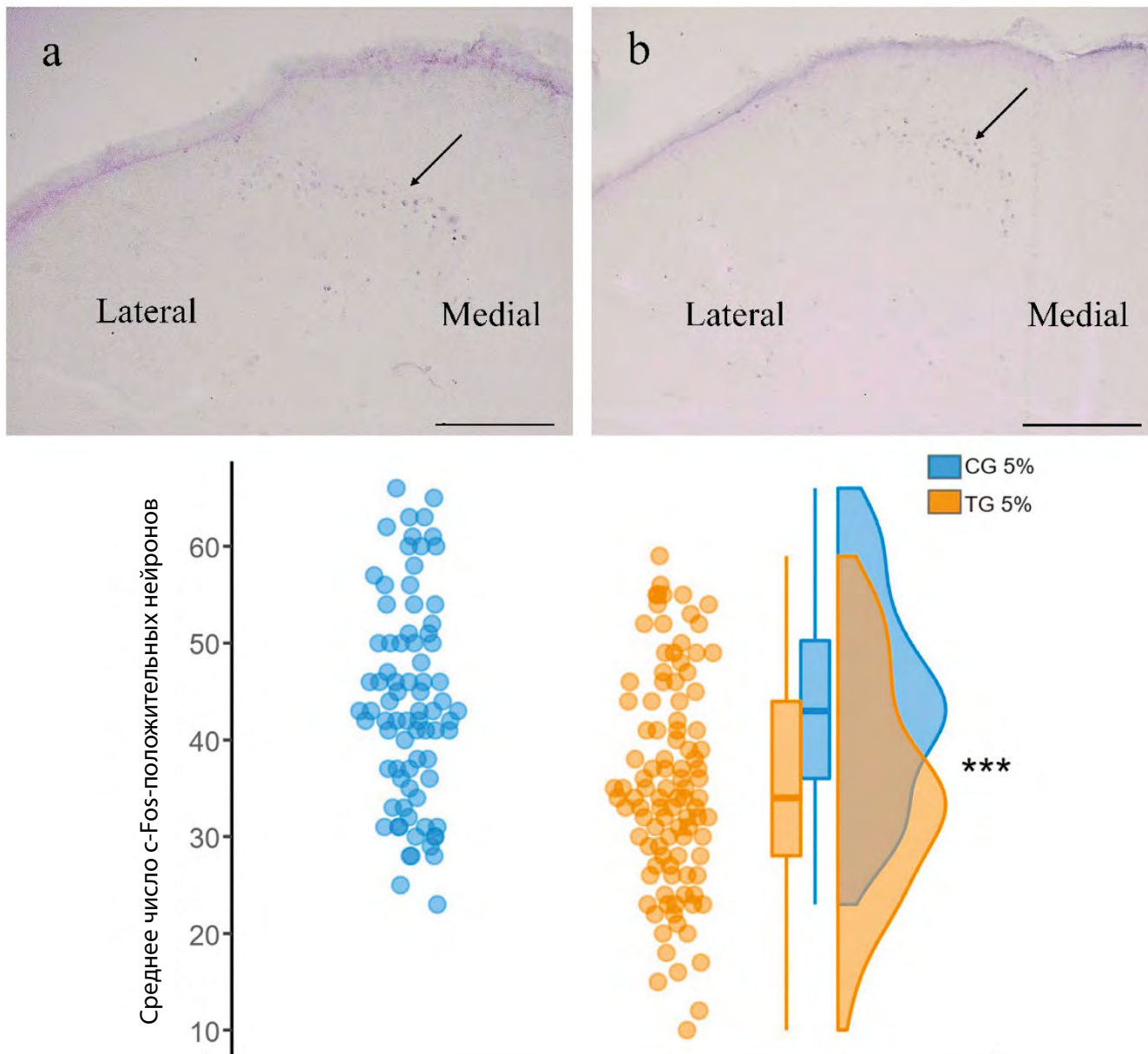


Рис. 3. Иммуногистохимическая реакция белка с-Fos в поверхностных пластинках (I–II) в контрольной группе (КГ) и группе, получавшей Нейробион (ОГ). Микрофотографии срезов дорсальных областей спинного мозга со стороны инъекции в КГ и ОГ (b) и среднее различие в числе нейронов показаны на схеме (c). Черные стрелки показывают с-Fos-положительные нейроны (***) $P < 0,001$.

ции поведения, уменьшающего боль, в исследовании с формалином. Двухстороннее повреждение задней поверхности грудного отдела спинного мозга препятствовало облегчению боли и снижало экспрессию *c-Fos* при инъекции энкефалина в желудочек мозга.

Хотя не был показан эффект от боли и ее уменьшения под действием Нейробиона в супраспинальной области с помощью гистохимических и иммуногистохимических реакций, так как вылизывание является супраспинальной реакцией, можно заключить, что Нейробион может играть роль в обезболивающем эффекте частично за счет влияния на эти области. С другой стороны, NADPH-d-положительные нейроны существуют не только в областях мозга, связанных

с болевыми путями, таких как гипоталамус, серое вещество вокруг центрального водопровода, ретикулярное ядро, большое ядро шва и голубое пятно [49], но также и в других областях, которые не участвуют в обработке боли, таких как покрывшечные ядра, верхний и нижний холмики, педункулопонтинное ядро, гиппокамповая извилина, супраоптическое ядро и полосатое тело. Это указывает на четкую роль NO в передаче и обработке другой информации в дополнение к болевой в разных областях головного мозга. Таким образом, в связи с разными ролями супраспинальных областей наблюдение и измерение эффекта Нейробиона в виде уменьшения боли не представляется возможным без изучения других факторов [50].

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования дают основания полагать, что предварительное введение витаминов В-комплекса способно уменьшить боль на хронической фазе. Снижение экспрессии *c-Fos* и NADPH-d в дорсальных нейронах спинного мозга в группе, получавшей витамины, дает основания полагать, что антиноцицептивный эффект Нейробиона может быть обусловлен подавлением ноцицептивной передачи на уровне спинного мозга, особенно в аффе-

рентной области поясничного отдела дорсального рога спинного мозга. Обезболивающий эффект Нейробиона может быть, хотя бы частично, результатом снижения числа активных нейронов после индукции боли, в месте входа афферентных волокон в спинной мозг. Эти активные нейроны используют NO в качестве как минимум одного нейромедиатора для передачи болевых импульсов, и снижение их активности коррелирует со снижением поведенческих проявлений боли.

Комментарий главного редактора

В марте 2023 г. в журнале *Nutritional Neuroscience* был опубликован обзор «Mechanisms of Action of Vitamin B₁ (Thiamine), B₆ (Pyridoxine), and B₁₂ (Cobalamin) in Pain: A Narrative Review», в котором приведены все известные механизмы действия нейротропных витаминов В в качестве модуляторов воспаления и боли. Особое внимание авторы обзора уделили механизмам антиноцицептивной активности витаминов группы В и синергическому взаимодействию с известными обезболивающими средствами

при болевых синдромах различной этиологии.

На основании приведенных данных можно сделать вывод, что комбинированное введение комплекса витаминов В играет очень важную роль в активации нисходящих систем модуляции боли за счет повышения центральной доступности этих систем нейромедиаторов, а также модуляции состояний гипервозбудимости в ЦНС. Это позволяет рекомендовать сочетание тиамин, пиридоксин и цианокобаламин в качестве адъювантной терапии в составе обезболивающих фармакотерапевтических схем у пациентов с болевым синдромом.

В российской клинической практике применяется препарат Нейробион®, в состав которого входит комплекс витаминов группы В в высоких терапевтических дозах. Нейробион® выпускается в двух лекарственных формах — таблетки, покрытые оболочкой, для применения per os, и ампулы с раствором для внутримышечного введения. Таблетированная форма содержит 100 мг тиамин дисульфида (В₁), 200 мг пиридоксин (В₆) и 0,2 мг цианокобаламин (В₁₂), раствор для инъекций — 100 мг В₁, 100 мг В₆ и 1 мг В₁₂.

Многочисленные данные молекулярно-биологических и клинических исследований позволяют рекомендовать высокодозные комплексы витаминов группы В, в частности препарат Нейробион®, для более широкого клинического применения у пациентов с болевым синдромом различного генеза, особенно у пациентов с неспецифической (смешанной) болью в спине.

* A. M. Paez-Hurtado, C. A. Calderon-Ospina, M. O Nava-Mesa. Mechanisms of Action of Vitamin B1 (Thiamine), B6 (Pyridoxine), and B12 (Cobalamin) in Pain: A Narrative Review. *Nutritional Neuroscience*. Vol. 26, Issue 3, p. 235–253.

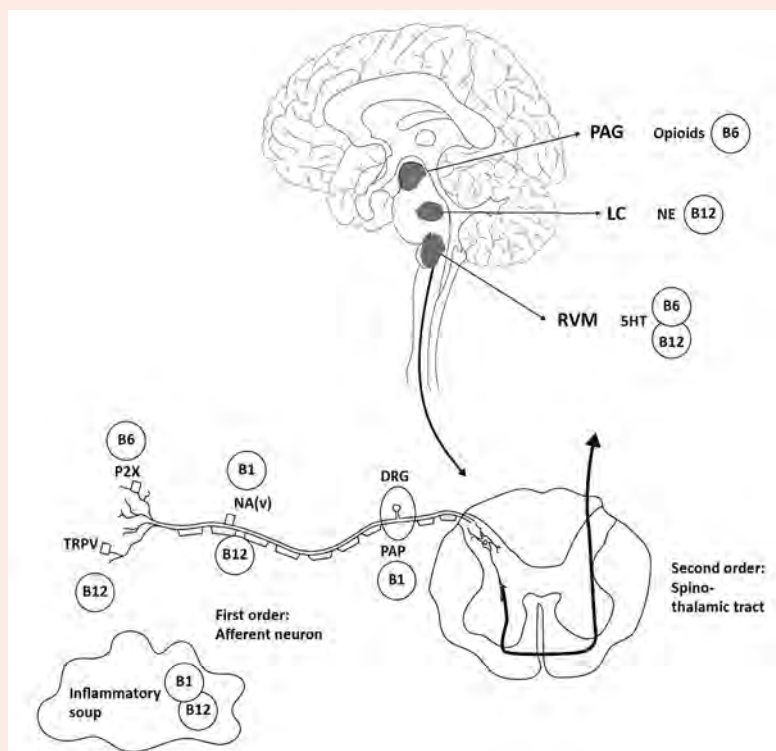


Рисунок. *Краткое представление основных антиноцицептивных механизмов витаминов В в нервной системе. На иллюстрации показан нейрон первого порядка (ноцицептивный первичный афферентный), передача к нейрону второго порядка (расположенному в заднем роге спинного мозга) и нисходящая система модуляции боли от ядер ствола мозга (PAG, LC и RVM) к спинному мозгу. Антиноцицептивные эффекты витаминов В представлены на каждом уровне этого пути, где они могут ослаблять механизмы передачи ноцицептивной информации, одновременно повышая активность нисходящей системы модуляции боли посредством нескольких систем нейромедиаторов. Сокращения: потенциал-зависимые натриевые каналы (NAv); голубоватое пятно (LC); ганглий дорсального корешка (DRG); простатическая кислая фосфатаза (PAP); норадреналин (NE); ростровентральный отдел ствола головного мозга (RVM); околоспинальное серое вещество (PAG); катионный канал, действующий по механизму транзитного рецепторного потенциала V1 (TRPV1), АТФ-зависимый пуриnergический рецептор P2X-типа (P2X); серотонин (5HT).



Литература

1. Gominak, S.C., 2016. Vitamin D deficiency changes the intestinal microbiome reducing B vitamin production in the gut. The resulting lack of pantothenic acid adversely affects the immune system, producing a 'pro-inflammatory' state associated with atherosclerosis and autoimmunity. *Med. Hypotheses* vol. 94.
2. REDMOND, A., 1957. Efficacy of vitamin B12 in the alleviation of the lightning pains of tabes dorsalis. *Br. J. Vener. Dis.* vol. 33 (2).
3. Steinberg, M.D., 2007. The use of vitamin B12 in Morton's neuralgia. *J. Am. Podiatr. Med. Assoc.* vol. 97 (4).
4. Menezes, R.R., et al., 2017. Thiamine and riboflavin inhibit production of cytokines and increase the anti-inflammatory activity of a corticosteroid in a chronic model of inflammation induced by complete Freund's adjuvant. *Pharmacol. Rep.* vol. 69 (5).
5. Hurt, J.K., et al., 2012. Prostatic acid phosphatase is required for the antinociceptive effects of thiamine and benfotiamine. *PLoS One* vol. 7 (10).
6. Song, X.S., Huang, Z.J., Song, X.J., 2009. Thiamine suppresses thermal hyperalgesia, inhibits hyperexcitability, and lessens alterations of sodium currents in injured, dorsal root ganglion neurons in rats. *Anesthesiology* vol. 110 (2).
7. Thériault, O., Poulin, H., Thomas, G.R., Friesen, A.D., Al-Shaqha, W.A., Chahine, M., 2014. Pyridoxal-5'-phosphate (MC-1), a vitamin B6 derivative, inhibits expressed P2X receptors. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* vol. 92 (3).
8. Erfanparast, A., Tamaddonfard, E., Nemati, S., 2017. Effects of intra-hippocampal microinjection of vitamin B12 on the orofacial pain and memory impairments induced by scopolamine and orofacial pain in rats. *Physiol. Behav.* vol. 170.
9. Hosseinzadeh, H., Moallem, S.A., Moshiri, M., Sarnavazi, M.S., Etemad, L., 2012. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of cyanocobalamin (Vitamin B12) against acute and chronic pain and inflammation in mice. *Arzneim. – Forsch. /Drug Res.* vol. 62 (7).
10. Bannon, A.W., Malmberg, A.B., 2007. Models of nociception: hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents. *Curr. Protoc. Neurosci.* Chapter 8.
11. Dzoyem, J.P., McGaw, L.J., Kuete, V., Bakowsky, U., 2017. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of african medicinal spices and vegetables. *Med. Spices Veg. Afr. Ther. Potential Metab., Inflamm. Infect. Syst. Dis.*
12. Murray, C.W., Porreca, F., Cowan, A., 1988. Methodological refinements to the mouse paw formalin test. An animal model of tonic pain. *J. Pharmacol. Methods* vol. 20 (2).
13. Berge, O.G., 2011. Predictive validity of behavioural animal models for chronic pain. *Br. J. Pharmacol.* vol. 164 (4).
14. Hunskaar, S., Fasmer, O.B., Hole, K., 1985. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J. Neurosci. Methods* vol. 14 (1).
15. Liu, X., Wang, N., Wang, J., Luo, F., 2019. Formalin-induced and neuropathic pain altered time estimation in a temporal bisection task in rats. *Sci. Rep.* vol. 9 (1).
16. Abramson, S.B., 2008. Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* vol. 10 (SUPPL. 2).
17. Janicki, P.K., Jeske-Janicka, M., 1998. Relevance of nitric oxide in pain mechanisms and pain management. *Curr. Rev. Pain.* vol. 2 (4).
18. Schmidtko, A., 2015. Nitric oxide-mediated pain processing in the spinal cord. *Handb. Exp. Pharm.* vol. 227.
19. Li, S., et al., 2019. Dependence of c-fos expression on amplitude of high-frequency spinal cord stimulation in a rodent model. *Neuromodulation* vol. 22 (2).
20. Chen, Y.K., Lei, J., Jin, L., Tan, Y.X., You, H.J., 2013. Dynamic variations of c-Fos expression in the spinal cord exposed to intramuscular hypertonic saline-induced muscle nociception. *Eur. J. Pain. (U. Kingd.)* vol. 17 (3).
21. Hossaini, M., Duraku, L.S., Kohli, S.K., Jongen, J.L.M., Holstege, J.C., 2014. Spinal distribution of c-Fos activated neurons expressing enkephalin in acute and chronic pain models. *Brain Res.* vol. 1543.
22. Baulmann, J., Spitznagel, H., Herdegen, T., Unger, T., Culman, J., 1999. Tachykinin receptor inhibition and c-Fos expression in the rat brain following formalin-induced pain. *Neuroscience* vol. 95 (3).
23. Hwang, H.J., et al., 2008. Antinociceptive effect of amygdalin isolated from *Prunus armeniaca* on formalin-induced pain in rats. *Biol. Pharm. Bull.* vol. 31 (8).
24. Luongo, L., et al., 2013. Palmitoylethanolamide reduces formalin-induced neuropathic-like behaviour through spinal glial/microglial phenotypical changes in mice. *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets* vol. 12 (1).
25. Ionov, I.D., Pushinskaya, I.I., Gorev, N.P., Frenkel, D.D., 2019. Antidepressants upregulate c-Fos expression in the lateral entorhinal cortex and hippocampal dorsal subiculum: Study in rats. *Brain Res. Bull.* vol. 153.
26. Grégoire, S., Etienne, M., Gaulmin, M., Caussade, F., Neuzeret, D., Ardid, D., 2012. New method to discriminate sedative and analgesic effects of drugs in the automated formalin test in rats. *Neurosci. Res.* vol. 72 (2).
27. Cairns, B.E., Gambarota, G., Dunning, P.S., Mulkern, R.V., Berde, C.B., 2003. Activation of peripheral excitatory amino acid receptors decreases the duration of local anesthesia. *Anesthesiology* vol. 98 (2).
28. Higashi, R., Krymchantowski, A.V., Cohen, J.C., Nunes, C.P., Boulanger, A., Geller, M., 2007. Evaluation of the safety and efficacy of an injectable B-vitamin combination in acute neuralgias. *Rev. Bras. Med.* vol. 64 (3).
29. Dimpfel, W., Spüler, M., Bonke, D., 1990. Influence of repeated vitamin B administration on the frequency pattern analysed from rat brain electrical activity (tele-stereo-EEG). *Klin. Wochenschr.* vol. 68 (2).
30. Calderon-Ospina, C.A., Nava-Mesa, M.O., Paez-Hurtado, A.M., 2020. Update on safety profiles of vitamins B1, B6, and B12: A narrative review. *Ther. Clin. Risk Manag.* vol. 16.
31. Chiu, C.K., Low, T.H., Tey, Y.S., Singh, V.A., Shong, H.K., 2011. The efficacy and safety of intramuscular injections of methylcobalamin in patients with chronic nonspecific low back pain: a randomised controlled trial. *Singap. Med. J.* vol. 52 (12).
32. Abbott, F.V., Franklin, K.B.J., Westbrook, R.F., 1995. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. *Pain* vol. 60 (1).
33. Allen, M., Poggiali, D., Whitaker, K., Marshall, T.R., van Langen, J., Kievit, R.A., 2021. Raincloud plots: a multi-platform tool for robust data visualization. *Wellcome Open Res.* vol. 4.
34. Team J. JASP, "Computer software. (Version 0.16.3)." 2022.
35. Reyes-García, G., Castillo-Henkel, C., Medina-Santillan, R., Ter'an-Rosales, F., Granados-Soto, V., 2002. Mechanisms of analgesic action of B vitamins in formalin-induced inflammatory pain. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* vol. 45.
36. Reyes-García, G., Medina-Santillan, R., Flores-Murrieta, F.J., Caram-Salas, N.L., Granados-Soto, V., 2006. Analgesic effects of B vitamins: a review. *Curr. Top. Pharmacol.* vol. 10 (1).
37. Surjana, D., Halliday, G.M., Damian, D.L., 2010. Role of nicotinamide in DNA damage, mutagenesis, and DNA repair. *J. Nucleic Acids*, 2010.
38. Rodella, L., Rezzani, R., Agostini, C., Bianchi, R., 1998. Induction of NADPH-diaphorase activity in the rat periaqueductal gray matter after nociceptive visceral stimulation (no). *Brain Res.* vol. 793, 1–2.
39. Gonz'alez, S., Labombarda, F., Gonzalez Deniselle, M.C., Saravia, F.E., Roig, P., De Nicola, A.F., 2001. Glucocorticoid effects on Fos immunoreactivity and NADPH-diaphorase histochemical staining following spinal cord injury. *Brain Res.* vol. 912 (2).
40. Weinberg, J.B., Chen, Y., Jiang, N., Beasley, B.E., Salerno, J.C., Ghosh, D.K., 2009. Inhibition of nitric oxide synthase by cobalamins and cobinamides. *Free Radic. Biol. Med.* vol. 46 (12).
41. Tsuruoka, M., Arai, Y.C.P., Nomura, H., Matsutani, K., Willis, W.D., 2003. Unilateral hindpaw inflammation induces bilateral activation of the locus coeruleus and the nucleus subcoeruleus in the rat. *Brain Res. Bull.* vol. 61 (2).
42. Traub, R.J., Solodkin, A., Gebhart, G.F., 1994. NADPH-diaphorase histochemistry provides evidence for a bilateral, somatotopically inappropriate response to unilateral hindpaw inflammation in the rat. *Brain Res.* vol. 647 (1).
43. Polgar, E., Sardella, T.C.P., Tiong, S.Y.X., Locke, S., Watanabe, M., Todd, A.J., 2013. Functional differences between neurochemically defined populations of inhibitory interneurons in the rat spinal dorsal horn. *Pain* vol. 154 (12).
44. Cao, J.L., Zeng, Y.M., Zhang, L.C., Duan, S.M., 2000. Increased expression of formalin-induced Fos and NADPH-d positive neurons in the spinal cord of morphine-tolerant rats. *Acta Physiol. Sin.* vol. 52 (3).
45. Honoré, P., Buritova, J., Besson, J.M., 1995. Carrageenin-evoked c-Fos expression in rat lumbar spinal cord: the effects of indomethacin. *Eur. J. Pharmacol.* vol. 272 (2–3).
46. Bullitt, E., 1990. Expression of C-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J. Comp. Neurol.* vol. 296 (4).
47. Roche, A.K., Cook, M., Wilcox, G.L., Kajander, K.C., 1996. A nitric oxide synthesis inhibitor (L-NAME) reduces licking behavior and Fos-labeling in the spinal cord of rats during formalin-induced inflammation. *Pain* vol. 66, 2–3.
48. Hashemi, M., Karami, M., Zarrindast, M., 2022. The regulatory role of nitric oxide in morphine-induced analgesia in the descending path of pain from the dorsal hippocampus to the dorsolateral periaqueductal gray. *Eur. J. Pain. (U. Kingd.)* vol. 26 (4).
49. Lee, J.H., Price, R.H., Williams, F.G., Mayer, B., Beitz, A.J., 1993. Nitric oxide synthase is found in some spinothalamic neurons and in neuronal processes that appose spinal neurons that express Fos induced by noxious stimulation. *Brain Res.* vol. 608 (2).
50. Bredt, D.S., Glatt, C.E., Hwang, P.M., Fotsuhi, M., Dawson, T.M., Snyder, S.H., 1991. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron* vol. 7 (4).