

اثر تجویز درون صفاقی و نخاعی اسید اسکوربیک و اسکوربات سدیم بر احساس

درد در موش صحرایی

ندا/ موحد اول^۱، دکتر مسعود فریدونی^{۲*}

۱. کارشناس ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

۲. دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

چکیده

سابقه و هدف: اسید اسکوربیک (Ascorbic acid) به وفور در مغز وجود داشته و بر تولید و انتقال میانجی‌های عصبی اثر می‌گذارد. در انتقال درد، سیستم گلوتاماترژیک نقش دارد. حضور اسید اسکوربیک، گیرنده‌های گلوتاماتی NMDA را مهار و به دلیل اسیدیت‌ی آن، ASIC و TPRV1 را فعال می‌کند. لذا بررسی اثر تجویز درون صفاقی (i.p) و یا نخاعی (i.t) اسید اسکوربیک و اسکوربات سدیم بر احساس درد، هدف این مطالعه است.

مواد و روش‌ها: موش‌های صحرایی نر بالغ و بیستار (۲۵۰-۲۰۰ گرم) در هشت گروه هفت‌تایی دریافت‌کننده‌ی سالین (i.p)، سالین (i.t)، اسید اسکوربیک (۱،۱۰،۱۰۰،۲۰۰ mg/kg, i.p)، اسید اسکوربیک (۰/۰۲ mg/۱۰µl, i.t) معمولی و خنثی (اسکوربات سدیم) استفاده شدند. آستانه‌ی درد، توسط آزمون Tail-flick (TF) و شدت احساس درد شیمیایی طی آزمون فرمالین تعیین شد.

یافته‌ها: اسید اسکوربیک (۱،۱۰،۱۰۰،۲۰۰ mg/kg, i.p) در آزمون TF، پردردی ($P<0/01$) و در آزمون فرمالین، کاهش درد ($P<0/05$) ایجاد کرد. اسید اسکوربیک داخل صفاقی با دوز ۱ mg/kg در آزمون TF فاقد اثر بود اما درد مرحله بینابینی آزمون فرمالین را کاهش داد ($P<0/01$). در تجویز نخاعی، اسید اسکوربیک با غلظت ۰/۰۲mg/۱۰µl در آزمون TF موجب پردردی شد ($P<0/001$)، ولی به صورت اسکوربات سدیم، بی‌اثر بود. تجویز نخاعی اسید اسکوربیک و اسکوربات سدیم، درد را در آزمون فرمالین کاهش دادند ($P<0/001$).

نتیجه‌گیری: پردردی ناشی از تجویز درون صفاقی اسید اسکوربیک در آزمون TF، شاید حداقل بخشی به دلیل اثر مهاری کمتر آن بر گیرنده‌های AMPA و در تجویز نخاعی علاوه بر آن، حساسیت گیرنده‌های TRPV1 و کانالهای ASIC به اسیدیت‌ی اسید اسکوربیک باشد، زیرا تجویز اسکوربات سدیم اثر پردردی از خود نشان نداد. احتمالاً اثرات مهاری اسید اسکوربیک و یا اسکوربات سدیم طی تجویز درون صفاقی و نخاعی، بر گیرنده‌های NMDA و کاهش رهایش Substance P و دیگر عوامل التهابی در بروز بی‌دردی طی آزمون فرمالین نقش داشته‌اند.

واژگان کلیدی: اسکوربیک اسید، اسکوربات سدیم، درد، تجویز درون صفاقی، تجویز نخاعی

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Movahhed Avval N, Fereidoni M. Effect of intraperitoneal and intrathecal administration of ascorbic acid and sodium ascorbate on pain in rat. *Pejouhandeh* 2014;19(2):66-77.

مقدمه

اسید اسکوربیک یا ویتامین ث، به عنوان یک عنصر غذایی بسیار مهم با مقادیر فراوان در بدن وجود دارد. اگر چه برخی گونه‌های جانوری قادر به سنتز آن نمی‌باشند، اما وجود آن در بدن بسیار ضروری است. تحقیقات متعددی در ارتباط با

مقادیر اسید اسکوربیک در بدن انجام گرفته که همگی حاکی از غلظت‌های فراوان آن در بیشتر اندام‌ها از جمله مغز می‌باشند (۱). از جمله ویژگی‌های اسید اسکوربیک می‌توان به خاصیت آنتی اکسیدانی، جلوگیری از مرگ سلولی، خاصیت ضد دردی و ضد التهابی، اثرات ضد تشنجی و ضد صرعی و اثرات ضد افسردگی اشاره نمود. یکی از مهمترین ویژگی‌های اسید اسکوربیک، توانایی ورود آن به سیستم عصبی مرکزی است (۲). همچنین وجود ناقل اختصاصی اسید اسکوربیک تحت عنوان Sodium-dependent Vitamin C (SVCT)

*نویسنده مسؤول مکاتبات: دکتر مسعود فریدونی؛ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، تلفن: ۰۹۱۵۵۲۴۲۰۱۵، نمابر: (۰۵۱) ۸۷۶۲۲۲۷؛ پست الکترونیک: fereidoni@um.ac.ir

کانال‌های یونی حساس به اسید (Acid-sensing ion channels - ASIC) می‌باشند. این کانال‌های کاتیونی، غیرحساس به ولتاژ بوده و با هیدروژن خارج سلولی فعال می‌شوند. بررسی‌ها نشان می‌دهند اسیدیته‌ی اسید اسکوربیک منجر به افزایش میزان فعالیت این کانال‌ها می‌شود (۱۳). با توجه به مطالب فوق، این سؤالات مطرح می‌شوند: نخست، آیا اسید اسکوربیک بر درد حرارتی و شیمیایی تأثیرگذار است؟ دوم، آیا تفاوتی بین اثر آن در تجویز سیستمیک و مرکزی در سطح نخاع وجود دارد؟ و سوم، اگر تجویز مرکزی اسید اسکوربیک در سطح نخاع بر انواع درد مذکور اثرگذار است، با توجه به اینکه اسید اسکوربیک به دلیل خاصیت اسیدی و پرواکسیدانی (۵)، ممکن است بر درد اثرگذار باشد، آیا تفاوتی بین اثرات تجویز مرکزی اسید اسکوربیک معمولی ($C_6H_8O_6$) و اسید اسکوربیک خنثی شده (اسکوربات سدیم $C_6H_7NaO_6$) وجود دارد؟ لذا، پاسخ به سؤالات فوق، هدف این مطالعه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، از موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با سن تقریبی ۲/۵ ماه و وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم استفاده شد. تمامی حیوانات در شرایط یکسان محیطی ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی و دمای 22 ± 2 درجه سانتیگراد و به دور از هر گونه آلودگی صوتی، در قفس‌های مخصوصی از جنس Plexy glass به صورت گروه‌های ۵ تا ۶ تایی نگهداری شدند. موش‌های صحرایی در تمام مدت به جز زمان انجام آزمایش‌ها به آب و غذا دسترسی آزاد داشته و چند روز قبل از انجام آزمایش‌ها برای تطابق با محیط، در فضای آزمایشگاه قرار می‌گرفتند و تنها برای انجام آزمایش‌ها از قفس خارج و سپس دوباره به محل خود برگردانده می‌شدند. تمامی مراحل آزمایش، بین ساعت ۱۰ صبح تا ۲ بعدازظهر انجام شدند. مراحل تکثیر و پرورش حیوانات در حیوان‌خانه و انجام آزمایش‌ها در آزمایشگاه تحقیقاتی فیزیولوژی جانوری دانشگاه فردوسی مشهد انجام گرفت. کلیه‌ی عملیات آزمایشگاهی روی موش‌ها با رعایت مقررات بین‌المللی اخلاق و حمایت از حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفت (۱۴). در این مطالعه از پودر اسید اسکوربیک (شرکت داروسازی اسوه، تهران) و از سالی‌ن به عنوان حلال دارو استفاده گردید. به منظور انجام آزمایش‌ها، حیوانات به صورت تصادفی در ۸ گروه هفت‌تایی شامل گروه دریافت‌کننده‌ی سالی‌ن به صورت درون صفاقی (intraperitoneal injection-i.p)، گروه دریافت‌کننده‌ی

Transporter) در سیستم عصبی و توانایی عبور آن از سد خونی- مغزی از دیگر موضوعات مهم می‌باشد (۳). خاصیت آنتی اکسیدانی اسید اسکوربیک یکی دیگر از ویژگی‌هایی است که آن را به عنوان فاکتوری مؤثر در برابر رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو و در حقیقت، یک عامل نوروپروتکتیو معرفی می‌کند (۴)؛ اما از سوی دیگر، اسید اسکوربیک در برخی غلظت‌ها به عنوان پرواکسیدان نیز ایفای نقش می‌کند (۵). اسید اسکوربیک در متابولیسم بیشتر میانجی‌های عصبی نقش به سزایی دارد. مطالعات نشان می‌دهند، سیستم‌های نورونی متعددی مانند گلوتاماترژیک، گابارژیک، دوپامینرژیک و سروتونرژیک در آزادسازی آن دخیل می‌باشند. بنابراین، اسید اسکوربیک قادر است بسیاری از رفتارهای عصبی و عملکردهای نورونی را تحت تأثیر قرار دهد (۲). اثرات ضد دردی اسید اسکوربیک نیز در آزمایش‌های بسیاری مورد بررسی قرار گرفته است (۶). با این وجود، برخی تحقیقات نیز از اثرات معکوس آن بر حس درد خبر داده‌اند (۷). همچنین، مطالعات گذشته حاکی از آنند که اسید اسکوربیک منجر به محافظت نورونی در مقابل اثرات سمی ناشی از گلوتامات می‌گردد. اسید اسکوربیک قادر است طی واکنش با گیرنده‌های NMDA و اثر بر بخش قابل احیای گیرنده، نقش مهاری خود را ایفا کند. از طرفی، اسید اسکوربیک خنثی شده (اسکوربات کلسیم) قادر به کاهش درد در بیماران مبتلا به ورم مفاصل و استخوان بوده است که این اثرات ضد دردی اسید اسکوربیک احتمالاً به دلیل واکنش با گیرنده‌های یونوتروپیک گلوتاماتی روی می‌دهند (۸). همچنین، اسید اسکوربیک در دوزهای بالا، اثراتی شبیه دیکلوفناک و مورفین در آزمون فرمالین از خود نشان می‌دهد (۹). بررسی‌های انجام گرفته روی موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نشان داد که تمرینات منظم ورزشی و مصرف خوراکی اسید اسکوربیک، پردردی ناشی از دیابت را کاهش می‌دهد (۱۰).

با توجه به اینکه اسید اسکوربیک دارای خاصیت اسیدی بوده و از آنجا که علاوه بر گیرنده‌های درد که بر پایانه‌های عصبی قرار داشته و پیام عصبی را انتقال می‌دهند، گیرنده‌هایی همچون TRPV1 (Transient receptor potential vanilloid) نیز در انتقال حس درد نقش داشته و با افزایش دما و در حضور پروتون‌ها (در pH اسیدی زیر ۶/۵) فعال می‌شوند (۱۱). وجود اسید اسکوربیک میزان بیان گیرنده TRPV1 را افزایش داده و با دارا بودن خاصیت اسیدی، موجب افزایش فعالیت این گیرنده‌ها می‌گردد (۱۲). همچنین از دیگر عواملی که در انتقال احساس درد مشارکت می‌کنند،

گردنی به آرامی از روی تیغه‌ی اکسی‌پیتال جمجمه کنار زده شدند. وسط غشای اطلس - اکسی‌پیتال، سوراخ کوچکی ایجاد گردید تا مایع مغزی - نخاعی خارج شود که نشانه‌ای از دسترسی به فضای تحت عنکبوتیه است. یک لوله‌ی پلی‌اتیلن (PE-10) به طول ۱۱ سانتیمتر آماده گردید و ۸ سانتیمتر از آن به آرامی در فضای تحت عنکبوتیه به طرف قطعه‌ی کمربندی نخاع پیش برده شد. ۳ سانتیمتر از لوله که به وسیله پارافیل، برجستگی کوچکی روی آن ایجاد گردید، خارج از نخاع برای تجویز دارو قرار گرفت. شایان ذکر است که پس از یک دوره‌ی بهبودی ۵ روزه پس از کانول‌گذاری، نباید در هیچ یک از حیوانات، نقص حرکتی دیده شود. در هر یک از گروه‌ها، دارو و یا سالین، به صورت نخاعی در حجم ۱۰ µl توسط لوله‌ی رابط و سرنگ هامیلتون تجویز گردید.

آزمون tail flick. به منظور سنجش آستانه‌ی درد در سطح نخاعی، از آزمون tail flick بر اساس روش D'Amour و Smith استفاده گردید (۱۶). در این آزمون، حیوان در محفظه‌ی محدود کننده به نحوی که دم آن بیرون باشد، قرار گرفت. سپس دم حیوان روی دستگاه قرار داده شد و با روشن کردن یک لامپ نوری، گرما به دم تابانده شد. اعمال حرارت ناشی از نور به دم حیوان، موجب پس کشیدن دم با حرکتی سریع شده و این فاصله‌ی زمانی بین شروع تحریک و زمان پاسخ، ثبت گردید (tail flick latency). این آزمون سه مرتبه و به فاصله‌ی زمانی یک دقیقه، در ناحیه‌ی یک سوم میانی دم حیوان انجام شد. میانگین این داده‌ها برای زمان پس کشیدن دم، به عنوان آستانه‌ی زمانی در بروز درد، برای هر حیوان در نظر گرفته شد. شدت نور دستگاه طوری تنظیم شد که زمان متوسط پاسخ‌دهی پایه، بین ۴ تا ۶ ثانیه باشد (intensity=۵). برای جلوگیری از هر گونه آسیب بافتی در حیوان، زمان cut-off برابر با ۱۵ ثانیه برای خاتمه‌ی تابش نور بر دم، در نظر گرفته شد. سپس جهت مقایسه‌ی گروه‌ها، میزان درصد حداکثر اثر ممکن (Maximum possible effect - %MPE) مطابق با فرمول زیر، محاسبه شد (۱۷).

$$\text{MPE\%} = \frac{\text{Post drug latency} - \text{Pre drug latency}}{\text{Cut-off time} - \text{Pre drug latency}} \times 100$$

آزمون فرمالین. جهت سنجش درد شیمیایی، از آزمون فرمالین به عنوان مدلی از درد تونیک (مزمن) استفاده گردید. این آزمون، بر اساس روش متداول Dennis و Dubuisson انجام شد (۱۸). برای این منظور، ۵۰ میکرولیتر از محلول

اسید اسکوربیک با دوزهای ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم (i.p)، گروه دریافت‌کننده‌ی سالین به صورت نخاعی (intrathecal injection - i.t)، گروه دریافت‌کننده‌ی اسید اسکوربیک با غلظت ۱۰ µl / ۰.۲ mg به صورت i.t و گروه اسید اسکوربیک با غلظت ۱۰ µl / ۰.۲ mg به صورت i.t دسته‌بندی شدند. برای خنثی کردن اسید اسکوربیک از محلول سدیم هیدروکساید ۰.۱٪ طی انجام عمل تیتراسیون استفاده گردید. در این پژوهش، غلظت اسید اسکوربیک جهت تجویز نخاعی، از دوزی که مطلوب‌ترین اثر را بر درد در مقایسه با دیگر دوزهای آزمایش شده طی تجویزهای درون صفاقی داشت، معادل‌سازی شد. برای این منظور، بخش کمربندی نخاع موش صحرایی بیرون آورده و توزین شد. وزن این قسمت به همراه مایعات همراه آن، ۰.۲ میلی گرم در نظر گرفته شد. با توجه به دوز ۱۰۰ mg/kg که به ازای هر ۱ گرم، ۰.۱ میلی گرم اسید اسکوربیک طی تجویز درون صفاقی تزریق می‌گردید، در نتیجه اگر وزن نخاع در محدوده کمربندی حدود ۰.۲ میلی گرم باشد، میزان دارو در هر تجویز نخاعی باید معادل ۰.۰۲ میلی گرم در هر ۱۰ µl باشد. علاوه بر این ۸ گروه، برای اطمینان از بی‌تأثیر بودن عمل جراحی جهت تجویزهای نخاعی در روند آزمایش، یک گروه از حیوانات دست نخورده نیز در نظر گرفته شد که در آن، حیوانات تحت عمل جراحی و همچنین تیمار قرار نگرفته ولی کلیه‌ی مراحل، مشابه سایر گروه‌ها روی آنها انجام گردید.

مراحل انجام آزمایش‌ها در تمام گروه‌ها به این ترتیب بود که ابتدا آستانه‌ی درد با استفاده از دستگاه tail flick (مدل Sparco، ایران) تعیین و پس از آن، تجویزهای درون صفاقی و نخاعی دارو انجام می‌گرفت. سپس، آستانه درد، ۳۰ دقیقه پس از تجویز داخل صفاقی و ۵ دقیقه پس از تجویز نخاعی دارو، مجدداً تعیین و بلافاصله، محلول فرمالین به پای راست عقبی حیوان تزریق و رفتار درد به مدت یک ساعت بررسی می‌شد.

کانول‌گذاری جهت تجویز نخاعی. کانول‌گذاری در فضای تحت عنکبوتیه‌ی نخاع جهت تجویز نخاعی، تکنیکی رایج در مطالعه‌ی مکانیسم نخاعی درد و بی‌دردی بوده و بر اساس روش Rudy و Yaksh صورت می‌گیرد (۱۵). برای این منظور، حیوانات با تزریق داخل صفاقی کتامین (۱۰۰ mg/kg) و زایلازین (۲۰ mg/kg) بیهوش شدند. سپس سر حیوان در دستگاه استریوتاکس (Narishige، ژاپن) جهت انجام جراحی، ثابت گردید. یک برش کوچک به طول ۲ سانتیمتر از بین گوش‌ها به طرف پایین ایجاد شد و عضلات

دریافت دارو) و گروه‌های دریافت‌کننده‌ی سالین به صورت i.p و سالین به صورت i.t حاکی از آن بود که اختلاف معنی‌داری در آستانه‌ی درد بین این گروه‌ها وجود نداشت. بنابراین، انجام عمل جراحی جهت تجویز نخاعی، بر ادامه‌ی روند آزمایش‌ها، بی‌تأثیر بود (نمودار ۱).

طی آزمون tail flick، نتایج حاصل از تجویز درون صفاقی دوزهای مختلف اسید اسکوربیک، نشان داد که تجویز داخل صفاقی دوز ۱ mg/kg اسید اسکوربیک، منجر به بروز اختلاف معنی‌داری در آستانه‌ی درد در مقایسه با گروه دریافت‌کننده‌ی سالین (i.p) نشد. این در حالی است که تجویز درون صفاقی اسید اسکوربیک با دوزهای ۱۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، به طور معنی‌داری آستانه‌ی درد را کاهش داده و سبب بروز پردردی شدند ($P < 0/01$) (نمودار ۲).

همچنین، مقایسه‌ی نتایج حاصل از آزمون tail flick نشان داد که تجویز نخاعی اسید اسکوربیک با غلظت ۱۰ μl / ۰/۲ mg به عنوان غلظت معادل مؤثرترین دوز اسید اسکوربیک (۱۰۰ mg/kg)، در ایجاد کمترین پردردی در مقایسه با سایر دوزها طی تجویزهای درون صفاقی، به طور معنی‌داری باعث کاهش آستانه‌ی درد و بروز پردردی در مقایسه با گروه دریافت‌کننده‌ی سالین (i.t) شد ($P < 0/01$). این در حالی است که تجویز نخاعی همان غلظت اسکوربات سدیم یا اسید اسکوربیک خنثی شده (۱۰ μl / ۰/۲ mg) منجر به بروز پردردی معنی‌داری نگردید. همچنین، مقایسه‌ی نتایج آزمون tail flick حاصل از تجویز درون صفاقی دوز ۱۰۰ mg/kg اسید اسکوربیک به عنوان مؤثرترین دوز در ایجاد کمترین پردردی و غلظت معادل آن در تجویز نخاعی (۱۰ μl / ۰/۲ mg)، اختلاف معنی‌داری از نظر قدرت ایجاد پردردی نشان نداد (نمودار ۳).

از طرفی، مقایسه‌ی نتایج حاصل از آزمون فرمالین در گروه حیوانات دست نخورده (بدون عمل جراحی و دریافت دارو) و گروه‌های دریافت‌کننده‌ی سالین i.p و سالین i.t، گویای این مطلب بود که هر سه گروه، مشابه یکدیگر عمل کرده و پاسخ‌های هر سه گروه شامل دو مرحله‌ی اول (نوروژنیک) و دوم (التهابی) آزمون فرمالین بود؛ ولی بین آنها، تفاوت معنی‌داری دیده نشد. بنابراین، تجویز سالین و عمل جراحی برای تجویز نخاعی، بر نتایج حاصل از آزمون فرمالین نیز بی‌تأثیر بود (نمودار ۴).

با توجه به نمودارهای ۵، نتایج حاصل از آزمون فرمالین پس از تجویز درون صفاقی دوزهای مختلف اسید اسکوربیک حاکی از آن بود که تجویز درون صفاقی دوز ۱ mg/kg

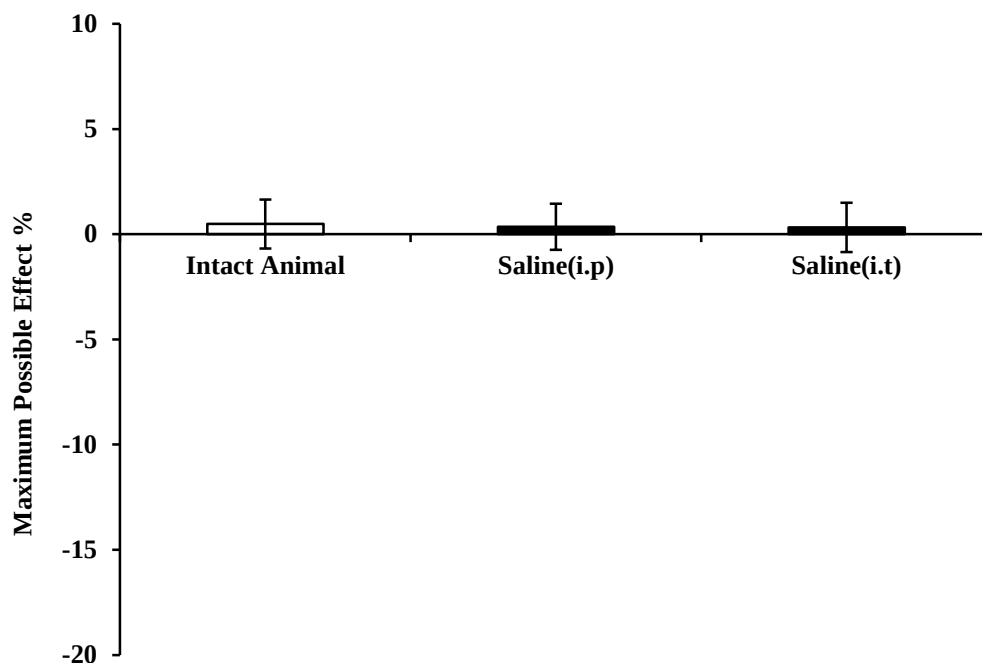
فرمالین ۲/۵٪ به صورت زیر جلدی به کف پای راست حیوان تزریق گردید و رفتار حیوان به مدت یک ساعت پس از تزریق، مورد بررسی قرار گرفت.

تزریق فرمالین به کف پا موجب ایجاد دو مرحله‌ی مشخص (نوروژنیک و التهابی) در رفتار درد می‌شود. مرحله‌ی اول درد در آزمون فرمالین، به مکانیسم‌های نوروژنیک وابسته بوده و پاسخ درد در این مرحله، ناشی از تحریک شیمیایی مستقیم فرمالین روی پایانه‌های عصبی محیطی است که تقریباً در ۱۰ دقیقه‌ی اول آزمون فرمالین رخ می‌دهد. این در حالی است که مرحله‌ی دوم درد در آزمون فرمالین نتیجه‌ی واکنش‌های التهابی در بافت‌های محیطی بوده و تقریباً از دقیقه‌ی ۱۶ تا ۲۰ آزمون فرمالین شروع و گاهی تا ۶۰ دقیقه به طول می‌انجامد و با سه رفتار مشخص لنگیدن، بالا بردن پا و لیسیدن یا گاز گرفتن پا همراه است. در بین مراحل اول و دوم آزمون فرمالین، یک مرحله‌ی بینابینی خاموش وجود دارد که تقریباً از دقیقه‌ی ۱۰ آزمون فرمالین شروع شده و تا دقیقه‌ی ۱۶ تا ۲۰ آزمون فرمالین به طول می‌انجامد و در طول این مرحله‌ی بینابینی، رفتارهای ناشی از درد، به مقدار اندکی در حیوان مشاهده می‌شود (۱۹).

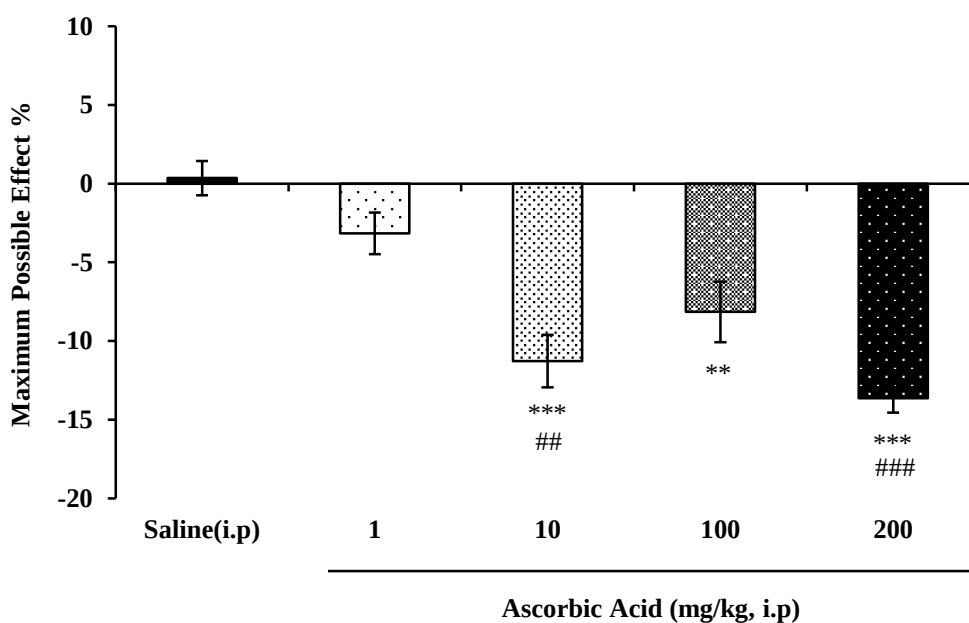
سپس، شدت درد شیمیایی در حیوان به صورت کمیته درآمده و از صفر تا سه درجه‌بندی می‌شود. بدین صورت که درجه‌ی صفر مربوط به حیوانی است که دردی نداشته باشد و بتواند وزن خود را بر روی پای مورد تزریق تحمل کند. اگر پای حیوان حین حرکت بلند و یا پنجه‌ی پای مورد تزریق را به آرامی بر سطح استراحت قرار دهد، درجه‌ی ۱ و اگر حیوان پای مورد تزریق را بالا بگیرد به نحوی که گاهی ناخن‌ها با سطح تماس داشته باشند، درجه‌ی ۲ محسوب می‌شود. درجه‌ی ۳ درد نیز مربوط به حالات لیسیدن و گاز گرفتن پای مورد تزریق توسط حیوان می‌باشد (۱۸). بدین ترتیب میزان کمی درد در حیوان پس از تزریق کف پای فرمالین، هر ۱۵ ثانیه ثبت و سپس میانگین آن در هر ۵ دقیقه محاسبه گردید. **آنالیزهای آماری.** تفاوت میزان درد با آزمون One Way ANOVA مشخص و متعاقب آن، مقایسه‌ی میانگین‌ها توسط آزمون Newman-Keuls انجام شد. به علاوه، $P < 0/05$ به عنوان حداقل سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

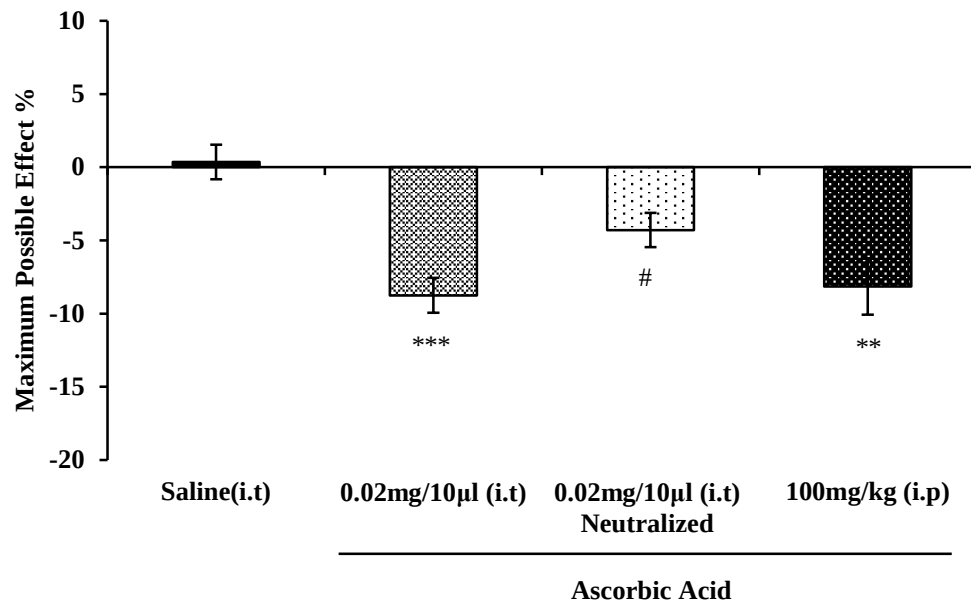
تحقیق حاضر، روی ۵۶ سر موش صحرایی در ۸ گروه هفت‌تایی انجام گرفت. مقایسه‌ی نتایج حاصل از آزمون tail-flick بین گروه حیوانات دست نخورده (بدون عمل جراحی و



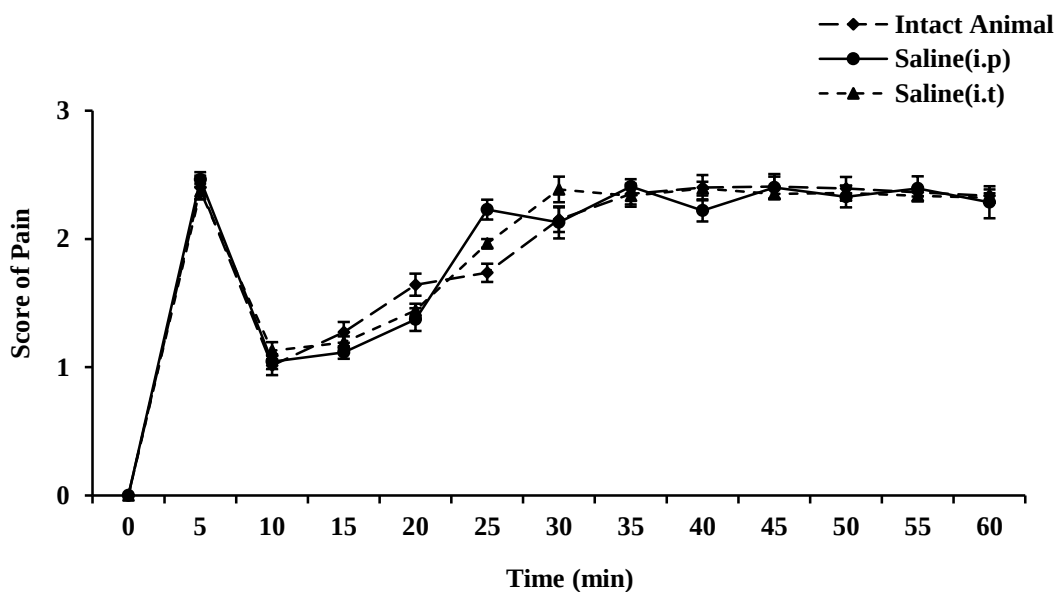
نمودار ۱. مقایسه آستانه درد در آزمون tail flick بین گروه حیوانات دست نخورده (بدون جراحی و تیمار) و گروه‌های دریافت‌کننده‌ی سالین به صورت تجویز درون صفاقی (i.p) و تجویز نخاعی (i.t).



نمودار ۲. اثر تجویز درون صفاقی دوزهای ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم اسید اسکوربیک بر آستانه‌ی درد طی آزمون tail flick. *** $P < 0.001$ و ** $P < 0.01$ در مقایسه با گروه دریافت‌کننده‌ی سالین (i.p) و ### $P < 0.001$ و ## $P < 0.01$ در مقایسه با گروه دریافت‌کننده‌ی دوز ۱ mg/kg اسید اسکوربیک.



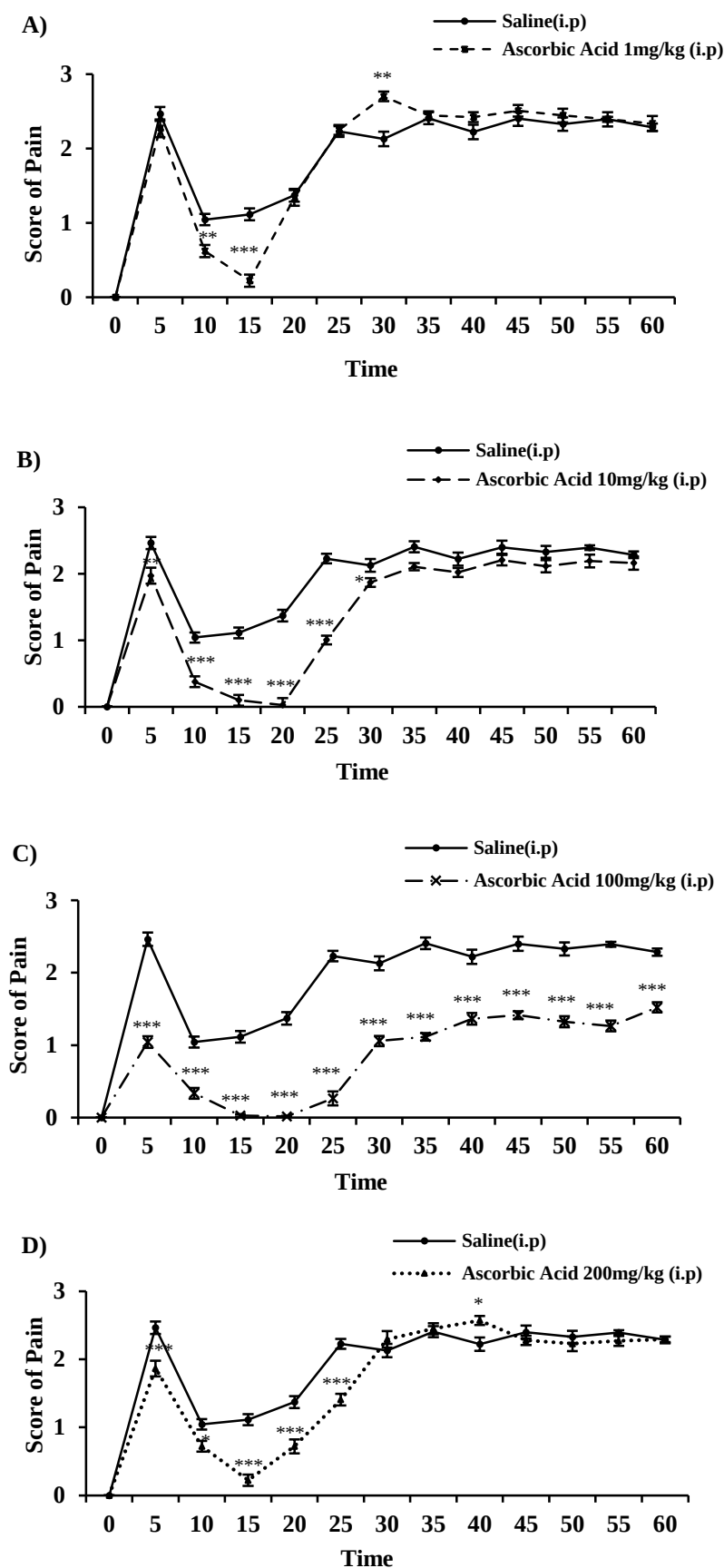
نمودار ۳. میزان آستانه‌ی درد طی آزمون tail flick بر حسب غلظت‌های اسید اسکوربیک معمولی و خنثی شده. $***P<0.001$ و $**P<0.01$ در مقایسه با گروه دریافت‌کننده‌ی اسید اسکوربیک معمولی (۱۰/۰۲ mg/µl). $#P<0.05$ و (i.t) در مقایسه با گروه دریافت‌کننده‌ی سالین (i.t).



نمودار ۴. میزان درد شیمیایی طی آزمون فرمالین در گروه‌های مورد مطالعه.

درون صفاقی اسید اسکوربیک با دوز ۱۰۰ mg/kg باعث شد که احساس درد شیمیایی ناشی از تزریق فرمالین در مراحل اول و دوم آزمون فرمالین، به طور معنی‌داری کاهش یابد ($P<0.001$) (نمودار ۵C). همچنین، تجویز درون صفاقی دوز ۲۰۰ mg/kg اسید اسکوربیک، منجر به کاهش احساس درد شیمیایی در مرحله‌ی اول و بینابینی آزمون فرمالین شد ($P<0.05$) (نمودار ۵B).

اسید اسکوربیک سبب کاهش احساس درد شیمیایی ناشی از تزریق کف پای فرمالین در مرحله‌ی بینابینی آزمون شد، اما تأثیری بر مراحل اول (نوروزنیک) و دوم (التهابی) آزمون فرمالین نداشت ($P<0.01$) (نمودار ۵A). همچنین، تجویز درون صفاقی اسید اسکوربیک با دوز ۱۰ mg/kg، منجر به کاهش احساس درد شیمیایی در مرحله‌ی اول و بینابینی آزمون فرمالین شد ($P<0.05$) (نمودار ۵B) و تجویز



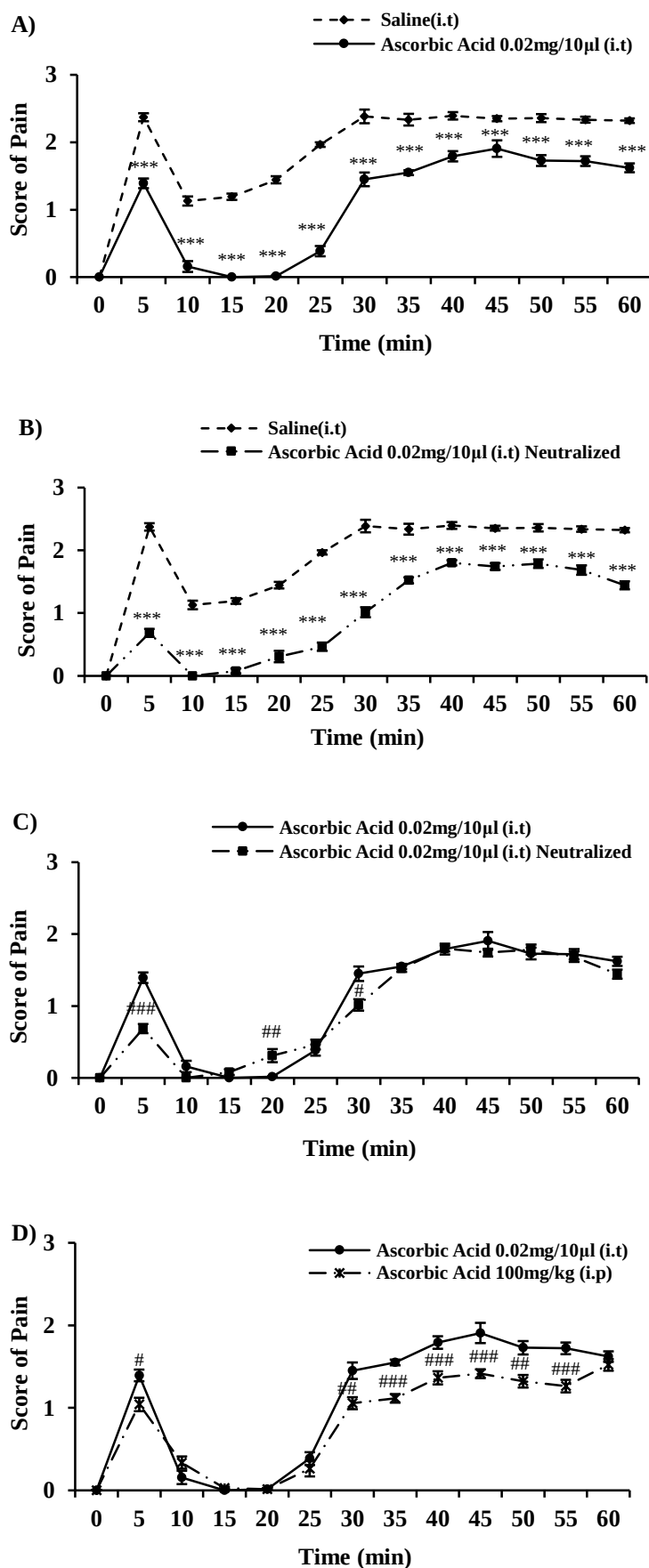
نمودار ۵. اثر تجویز درون صفاقی دوزهای مختلف اسید اسکوربیک بر احساس درد شیمیایی طی آزمون فرمالین. $***P<0.001$. $**P<0.01$ و $*P<0.05$ در مقایسه با گروه دریافت کننده ی سالین (i.p).

همچنین، با توجه به نمودار ۶، نتایج حاکی از آن بود که تجویز نخاعی اسید اسکوربیک ($0.2 \text{ mg}/10 \mu\text{l}$) معمولی و خنثی شده (اسکورات سدیم)، سبب کاهش معنی‌دار احساس درد شیمیایی ناشی از تزریق کف پایی فرمالین در هر دو مرحله‌ی اول و دوم آزمون فرمالین در مقایسه با گروه دریافت‌کننده‌ی سالین (i.t.) گردید ($P < 0.001$) (نمودارهای ۶A و ۶B). اما نتایج حاصل از آزمون فرمالین مؤید آن بود که تجویز نخاعی غلظت $0.2 \text{ mg}/10 \mu\text{l}$ اسکورات سدیم یا اسید اسکوربیک خنثی شده در مقایسه با اسید اسکوربیک معمولی، سبب کاهش بیشتر احساس درد شیمیایی ناشی از تزریق کف پایی فرمالین در مرحله‌ی اول آزمون فرمالین شد؛ این در حالی است که در مرحله‌ی دوم آزمون فرمالین، اثر قابل توجهی بر احساس درد نداشت ($P < 0.05$) (نمودار ۶C). از طرفی، تجویز درون صفاقی اسید اسکوربیک با دوز 100 mg/kg ، به عنوان مؤثرترین دوز در کاهش احساس درد شیمیایی ناشی از تزریق کف پایی فرمالین طی تجویزهای درون صفاقی، در مقایسه با تجویز نخاعی غلظت معادل آن، منجر به کاهش بیشتری در احساس درد شیمیایی ناشی از تزریق کف پایی فرمالین در هر دو مرحله‌ی اول و دوم آزمون فرمالین گردید ($P < 0.05$) (نمودار ۶D).

بحث

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد تجویز درون صفاقی و نخاعی اسید اسکوربیک، منجر به کاهش آستانه‌ی درد در آزمون tail flick و به عبارتی، منجر به بروز پردردی گردید. علیرغم این تصور که شاید حضور مقادیر بیشتر اسکوربیک اسید می‌تواند موجب افزایش پردردی در آزمون tail flick شود، اما نتایج حاکی از آن بود که تجویز درون صفاقی دوز 100 mg/kg اسید اسکوربیک، میزان پردردی را در آزمون tail flick تا حدی کاهش داده است. مطالعات پیشین نیز نشان داده‌اند که اثرات اسید اسکوربیک وابسته به دوز بوده (۸) که ضمن همسویی با یافته‌های پژوهش حاضر در محدوده‌ی دوزهای ۱ تا 10 میلی‌گرم بر کیلوگرم طی تجویزهای درون صفاقی، گاهی ضد و نقیض و پیچیده بوده‌اند که مستلزم تحقیق و بررسی بیشتر هستند. با توجه به نتایج حاصل از آزمون tail flick، وجود خاصیت اسیدی در اسید اسکوربیک طی تجویزهای نخاعی، در نحوه‌ی بروز عملکرد آن تأثیر چشمگیری داشته است، چرا که با خنثی کردن آن، اثرات پردردی اسید اسکوربیک در سطح نخاع، طی آزمون tail flick از میان رفته است. بنابراین می‌توان گفت احتمالاً

اسیدیته‌ی اسید اسکوربیک در تجویزهای نخاعی، بر نحوه‌ی اثر آن در احساس درد در سطح نخاع طی آزمون tail flick حایز اهمیت می‌باشد. با توجه به تقسیم‌بندی فیبرهای انتقال‌دهنده‌ی حس درد، احتمالاً بخشی از سیگنال‌های درد در آزمون tail flick توسط فیبرهای Aδ منتقل می‌شود (۱۱)، چرا که میانجی عصبی فیبرهای Aδ در شاخ پشتی گلوتامات است که بر گیرنده‌های AMPA اثر می‌گذارد (۲۰)، در حالی که فیبرهای C در شاخ پشتی نخاع، گلوتامات و پپتیدهایی مانند Substance P را به عنوان میانجی عصبی مورد استفاده قرار می‌دهند، با این تفاوت که گیرنده‌هایی که این میانجی‌ها بر آنها تأثیر می‌گذارند، علاوه بر AMPA، NMDA نیز می‌باشد که گیرنده‌های NMDA با دپلاریزاسیون مداوم، تحریک شده و سهم بسیار بیشتری در تحریک ناشی از فیبرهای C دارا می‌باشند (۱۱). مطالعات پیشین مؤید نقش فیبرهای Aδ در انتقال پیام درد و اثر مهارى کمتر اسید اسکوربیک بر گیرنده‌های AMPA در مقایسه با گیرنده‌های NMDA می‌باشند (۸). با توجه به این مطالب، شاید بتوان اثرات پردردی تجویز درون صفاقی اسید اسکوربیک طی آزمون tail flick را توجیه کرد. از طرفی، ضمن مشاهده‌ی اهمیت اسیدیته‌ی اسید اسکوربیک در ایجاد پردردی در سطح نخاع در آزمون tail flick، با توجه به یافته‌های پیشین، اگرچه نحوه‌ی فعالیت گیرنده‌های AMPA در pH اسیدی هنوز معلوم نیست (۲۱ و ۲۲)، برخی از مطالعات، خبر از افزایش فعالیت گیرنده‌های AMPA در pH اسیدی را می‌دهند (۲۳) و شاید بتوان این موضوع را دلیلی بر فعالیت بیشتر این گیرنده‌ها در pH اسیدی ناشی از اسید اسکوربیک تصور کرد. علاوه بر آن، مطالعات پیشین نشان داده‌اند که اسید اسکوربیک به علت داشتن خاصیت اسیدی، موجب تحریک گیرنده‌های TRPV1 دخیل در انتقال درد (۱۲) و کانال‌های ASIC حساس به pH اسیدی (۱۳) می‌شود. در نتیجه می‌توان به عنوان مکانیسم احتمالی بروز اثرات پردردی حاصل از تجویز نخاعی اسید اسکوربیک تصور کرد که طی آزمون tail flick، محرک دردزا موجب آزادسازی میانجی عصبی گلوتامات می‌گردد. گیرنده‌های TRPV1 و کانال‌های ASIC در pH اسیدی حاصل از اسید اسکوربیک طی تجویز نخاعی تحریک می‌شوند و بر اثر مهارى اسید اسکوربیک بر گیرنده‌های AMPA غلبه می‌کنند. در نتیجه، تجویز نخاعی اسید اسکوربیک موجب القای پردردی می‌گردد و در حالت خنثی شده (اسکورات سدیم)، این پردردی کاهش یافته است. از طرفی، با توجه به نتایج این مطالعه طی مرحله



نمودار ۶. مقایسه‌ی احساس درد شیمیایی طی آزمون فرمالین در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی غلظت ۰/۰۲ mg/۱۰ µl اسید اسکوربیک معمولی و اسید اسکوربیک خنثی شده (اسکورات سدیم) طی تجویز نخاعی و گروه دریافت‌کننده‌ی دوز ۱۰۰ mg/kg اسید اسکوربیک (به عنوان مؤثرترین دوز در کاهش احساس درد شیمیایی) طی تجویز درون صفاقی. $***P < 0.001$ در مقایسه با گروه دریافت‌کننده‌ی سالین (i.t) و $###P < 0.001$ ، $##P < 0.01$ و $\#P < 0.05$ در مقایسه با گروه دریافت‌کننده‌ی اسید اسکوربیک معمولی (۰/۰۲ mg/۱۰ µl).

اول (نوروژنیک) آزمون فرمالین، درد در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی اسید اسکوربیک طی تجویز درون صفاقی و نخاعی کاهش یافت. از آنجا که انتقال حس درد در مراحل آزمون فرمالین عمدتاً بر عهده‌ی فیبرهای C می‌باشد (۱۹)، با توجه به اثر مهاری اسید اسکوربیک بر سیستم گلوتاماترژیک و به خصوص گیرنده‌ی یونوتروپیک گلوتاماتی NMDA و ماده‌ی P و همچنین اثر مهاری کمتر بر گیرنده‌های AMPA و کاینات (۸)، ممکن است یکی از دلایل اثرات ضددردی اسید اسکوربیک در آزمون فرمالین، تداخل مهاری آن با سیستم گلوتاماترژیک باشد. به هر حال تأثیر اسید اسکوربیک در فعال شدن سایر مکانیسم‌های درون‌زاد مهاری در سطح نخاع (۲۴) از جمله سیستم‌های اپیوئیدرژیک (۲۵)، GABA_A (۲۶) و NO (۴) را نباید از نظر دور داشت. بنابراین، احتمالاً اثراتی که اسید اسکوربیک بر سیستم‌های غیر از سیستم گلوتاماترژیک می‌گذارد نیز توضیحی بر اثرات ضد دردی آن فراهم می‌کند. یافته‌های حاصل از این پژوهش همچنین نشان داد فرم خنثی شده‌ی اسید اسکوربیک (اسکوربات سدیم) طی تجویز نخاعی، دارای اثرات بی‌دردی بیشتری فقط در مرحله اول آزمون فرمالین در مقایسه با اسید اسکوربیک معمولی بوده است. بنابراین، شاید بتوان گفت حالت اسیدی اسید اسکوربیک طی تجویز نخاعی، ضمن مهار درد شیمیایی در آزمون فرمالین، خود به نوعی موجب ایجاد حس درد می‌شود، به طوری که در مجموع، اسید اسکوربیک معمولی اثر بی‌دردی کمتری نسبت به اسکوربات سدیم یا فرم خنثی شده‌ی آن بروز می‌دهد. به علاوه، به دلیل خاصیت اسیدی اسید اسکوربیک طی تجویز نخاعی، خاصیت پرواکسیدانی بیشتری نسبت به فرم خنثی شده‌ی آن خواهد داشت (۵) و شاید به این دلیل که در فرم اسیدی، قدرت مهاری گیرنده‌هایی همچون NMDA کمتر می‌شود (۲۷) فرم اسیدی، اثر ضد دردی کمتری در مرحله‌ی اول آزمون فرمالین بروز داده است. همچنین بررسی‌ها نشان می‌دهند که آسیب بافتی در مرحله‌ی دوم آزمون فرمالین، آزادسازی میانجی‌های التهابی همچون هیستامین، NO و رادیکال‌های آزاد از سلول‌های آسیب دیده را به همراه داشته و فراخوان سلول‌های ایمنی، میانجی‌های التهابی بیشتری مانند سیتوکاین‌ها و کموکاین‌ها را آزاد می‌کند. علاوه بر میانجی‌های التهابی، فاکتورهای نوروژنیک مانند ماده‌ی P و CGRP (Calicitonin gene-related peptide) نیز از پایانه‌های محیطی آوران‌های اولیه آزاد می‌شوند که به صورت غیرمستقیم در فعالیت گیرنده‌های درد طی التهاب نقش دارند. مطالعات گذشته نشان داده‌اند که اسید اسکوربیک دارای

اثرات ضد التهابی قابل ملاحظه‌ای است (۲۸). همچنین، بررسی روی بافت چشم نشان داد که اسید اسکوربیک با خاصیت آنتی اکسیدانی خود قادر است رادیکال‌های آزاد از جمله ROS که در فرآیندهای التهابی دخیل است را کاهش دهد (۲۹). از سوی دیگر، اسید اسکوربیک بر ماده‌ی P نیز که از فاکتورهای نوروژنیک دخیل در پاسخ‌های التهابی است، اثر مهاری داشته است (۸). علاوه بر آن، اثرات نوروپروتکتیو اسید اسکوربیک موجب کاهش فعالیت آنزیم سیکلواکسیژناز و سنتز پروستاگلندین‌ها شده است (۳۰). با توجه به مطالب پیشین، شاید بتوان گفت که اسید اسکوربیک در مرحله‌ی دوم آزمون فرمالین، رهایش عوامل دخیل در انتقال دردهای التهابی، همچون ماده‌ی P و یا CGRP را مهار نموده و با مجموع این اثرات ضد التهابی، احتمالاً باعث مهار درد در مرحله‌ی دوم آزمون فرمالین شده است. همچنین، در مرحله‌ی التهابی آزمون فرمالین، عدم تفاوت اثر اسید اسکوربیک در فرم اسیدی و خنثی شده (اسکوربات سدیم) در مهار عوامل دخیل در مرحله‌ی درد التهابی و احتمالاً بافری شدن اسیدیته‌ی اسید اسکوربیک توسط مکانیسم‌های بافتی طی تجویز درون صفاقی، تفاوت چشمگیری بین حالت معمولی و خنثی شده‌ی اسید اسکوربیک دیده نشده است.

در مجموع، نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد اسید اسکوربیک باعث ایجاد پردردی در آزمون tail flick شده که احتمالاً با اثر مهاری کمتر بر گیرنده‌های AMPA، افزایش فعالیت گیرنده‌های AMPA در pH اسیدی و تحریک گیرنده‌های TRPV1 و کانال‌های ASIC به دلیل اسیدیته‌ی اسید اسکوربیک، پردردی حاصل شده است. از طرفی، اسید اسکوربیک با مهار گیرنده‌های NMDA و ماده‌ی P، کاهش غلظت گلوتامات، فعال شدن مکانیسم‌های درون‌زاد مهاری مانند سیستم گابارژیک، کاهش درد را در آزمون فرمالین در پی داشته است. ضمن مقایسه‌ی بین نتایج حاصل از تجویز درون صفاقی و نخاعی اسید اسکوربیک، شاید بتوان گفت حداقل بخشی از اثرات بی‌دردی مشاهده شده از تجویز درون صفاقی اسید اسکوربیک در آزمون فرمالین، از طریق نخاع اعمال می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله، حاصل بخشی از پایان‌نامه‌ی دانشجویی بوده که با حمایت دانشگاه فردوسی مشهد اجرا گردید. بدین‌وسیله از دانشگاه فردوسی مشهد قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Pohanka M, Pejchal J, Snopkova S, Havlickova K, Karasova JZ, Bostik P, *et al.* Ascorbic acid: an old player with a broad impact on body physiology including oxidative stress suppression and immunomodulation: a review. *Mini Rev Med Chem* 2012;12(1):35–43.
2. Gu PF, Wu CF, Yang JY, Shang Y, Hou Y, Bi XL, *et al.* Differential effects of drug-induced ascorbic acid release in the striatum and nucleus accumbens of freely moving rats. *Neurosci Lett* 2006;399(1–2):79–84.
3. May JM, Qu ZC, Qiao H. Transfer of ascorbic acid across the vascular endothelium: mechanism and self-regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;297(1):C169–78.
4. Moretti M, Budni J, Dos Santos DB, Antunes A, Daufenbach JF, Manosso LM, *et al.* Protective effects of ascorbic acid on behavior and oxidative status of restraint-stressed mice. *J Mol Neurosci* 2013;49(1):68–79.
5. Kang MJ, Lee SS, Koh HC. Prooxidant properties of ascorbic acid in the nigrostriatal dopaminergic system of C57BL/6 mice. *Toxicology* 2012;294(1):1–8.
6. Besse JL, Gadeyne S, Galand-Desmé S, Lerat JL, Moyon B. Effect of vitamin C on prevention of complex regional pain syndrome type I in foot and ankle surgery. *Foot Ankle Surg* 2009;15(4):179–82.
7. Oyadeyi AS, Ajao FO, Afolabi AO, Udoh US, Ibironke GF. Chronic vitamin C administration induces thermal hyperalgesia in male rats. *Niger J Health Biomed Sci* 2005;4(2):153–5.
8. Rosa KA, Gadotti VM, Rosa AO, Rodrigues AL, Calixto JB, Santos AR. Evidence for the involvement of glutamatergic system in the antinociceptive effect of ascorbic acid. *Neurosci Lett* 2005;381(1–2):185–8.
9. Zeraati F, Araghchian M, Fazlian M, Torabian S, Mahjoub H. Antinociceptive effects of the ascorbic acid in comparison with diclofenac and morphine in the male mice. *Eur J Pain* 2006;10(S1):55.
10. Bigdeli Y, Heidarianpour A. Effect of regular exercise and vitamin C on pain threshold in diabetic rats. *J Arak Univ Med Sci* 2012;15(4):10–7. (Full Text in Persian)
11. Fein A. Nociceptors and the perception of pain. University of Connecticut Health Center. 2012. p. 1-6.
12. Kim KS, Yoo HY, Park KS, Kim JK, Zhang YH, Kim SJ. Differential effects of acute hypoxia on the activation of TRPV1 by capsaicin and acidic pH. *J Physiol Sci* 2012;62(2):93–103.
13. Leffler A, Mönter B, Koltzenburg M. The role of the capsaicin receptor TRPV1 and acid-sensing ion channels (ASICs) in proton sensitivity of subpopulations of primary nociceptive neurons in rats and mice. *Neuroscience* 2006;139(2):699–709.
14. Zimmermann M. Ethical considerations in relation to pain in animal experimentation. *Acta Physiol Scand Suppl* 1986;554:221–33.
15. Yaksh TL, Rudy TA. Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiol Behav* 1976;17(6):1031–6.
16. D'Amour EF, Smith DL. A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther* 1941;72:74–9.
17. Ahmadiani A, Fereidoni M, Semnani S, Kamalinejad M, Saremi S. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Sambucus ebulus* rhizome extract in rats. *J Ethnopharmacol* 1998;61(3):229–35.
18. Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977;4(2):161–74.
19. Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992;51(1):5–17.
20. Helms JE, Barone CP. Physiology and treatment of pain. *Critical Care Nurse* 2008;28(6):38–49.
21. Ihle EC, Patneau DK. Modulation of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor desensitization by extracellular protons. *Mol Pharmacol* 2000;58(6):1204–12.
22. Pittaluga A, Segantini D, Feligioni M, Raiteri M. Extracellular protons differentially potentiate the responses of native AMPA receptor subtypes regulating neurotransmitter release. *Br J Pharmacol* 2005;144(2):293–9.
23. McDonald JW, Bhattacharyya T, Sensi SL, Lobner D, Ying HS, Canzoniero LM, *et al.* Extracellular acidity potentiates AMPA receptor-mediated cortical neuronal death. *J Neurosci* 1998;18(16):6290–9.
24. Dai F, Yang JY, Gu PF, Hou Y, Wu CF. Effect of drug-induced ascorbic acid release in the striatum and the nucleus accumbens in hippocampus-lesioned rats. *Brain Res* 2006;1125(1):163–70.
25. Alaei H, Esmaeili M, Nasimi A, Pourshanazari A. Ascorbic acid decreases morphine self-administration and withdrawal symptoms in rats. *Pathophysiology* 2005;12(2):103–7.
26. Calero CI, Vickers E, Moraga Cid G, Aguayo LG, von Gersdorff H, Calvo DJ. Allosteric modulation of retinal GABA receptors by ascorbic acid. *J Neurosci* 2011;31(26):9672–82.

27. Gottfried JA, Chesler M. Endogenous H⁺ modulation of NMDA receptor-mediated EPSCs revealed by carbonic anhydrase inhibition in rat hippocampus. *J Physiol* 1994;478 Pt 3:373–8.
28. Gunes T, Bozok S, Kestelli M, Yurekli I, Ilhan G, Ozpak B, *et al.* α -tocopherol and ascorbic acid in early postoperative period of cardiopulmonary bypass. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 2012;13(11):691–9.
29. Peponis V, Papathanasiou M, Kapranou A, Magkou C, Tyligada A, Melidonis A, *et al.* Protective role of oral antioxidant supplementation in ocular surface of diabetic patients. *Br J Ophthalmol* 2002;86(12):1369–73.
30. Candelario-Jalil E, Akundi RS, Bhatia HS, Lieb K, Appel K, Muñoz E, *et al.* Ascorbic acid enhances the inhibitory effect of aspirin on neuronal cyclooxygenase-2-mediated prostaglandin E2 production. *J Neuroimmunol* 2006;174(1–2): 39–51.