

## مقاله پژوهشی

## نقش گیرنده‌های اپیوئیدی و کانابینوئیدی نوع ۱ در اثرات ضد دردی مرکزی ویتامین ث در مدل درد فرمالینی در موش‌های صحرایی

امیر عرفان پرست<sup>\*</sup>، اسماعیل تمدن فرد، سینا تمدن فرد، یاسین اسماعیلو، راضیه دانشیار، درسا رئیس‌یان

بخش فیزیولوژی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

پذیرش: ۱۵ دی ۱۴۰۰

دریافت: ۹ آذر ۱۴۰۰

## چکیده

**زمینه و هدف:** اگرچه اثرات ضددردی ویتامین ث در برخی از مطالعات گزارش شده است، ولی اثرات ضددردی مرکزی آن و مکانیسم‌های درگیر تاکنون بررسی نشده است. در این مطالعه، اثرات مرکزی ویتامین ث در آزمون درد فرمالینی کف پائی بررسی شد. برای پی بردن به مکانیسم اثر احتمالی این ویتامین، از نالوکسون (آنتاگونیست اپیوئیدی) و AM251 (آنتاگونیست گیرنده‌های نوع ۱ کانابینوئیدی) استفاده شد.

**روش‌ها:** برای تزریق داروها، در موش‌های صحرایی بیهوش شده با کتامین و گزیلازین در بطن چهارم مغز کانول راهنما قرار داده شد. درد فرمالینی با تزریق زیرجلدی فرمالین (۲/۵٪ و به حجم ۵۰ میکرولیتر) در کف پای حیوان ایجاد شد و مدت زمان لیسیدن و گازگرفتن پنجه پا به عنوان شاخص درد، برای مدت یک ساعت ثبت گردید.

**یافته‌ها:** یک درد دومرحله‌ای مشخص (مرحله اول: دقایق صفر تا ۵ و مرحله دوم: دقایق ۱۵ تا ۵۰) به دنبال تزریق کف پائی فرمالین ایجاد شد. تزریق داخل بطنی مغزی ویتامین ث موجب کاهش معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) هر دو مرحله اول و دوم درد شد. تزریق نالوکسون و AM251 به تنهایی اثر معنی‌داری بر شدت درد نگذاشت، اما پیش تزریق آن‌ها از کاهش درد ایجاد شده توسط ویتامین ث جلوگیری کرد. همه درمان‌های ذکر شده در بالا فعالیت حرکتی را تغییر ندادند.

**نتیجه‌گیری:** ویتامین ث احتمالاً با اثر بر مراکز مغزی پردازش‌کننده درد موجب کاهش درد نورونیک و التهابی می‌شود و در این عملکرد مغزی، گیرنده‌های اپیوئیدی و کانابینوئیدی ممکن است دخالت داشته باشند.

**واژه‌های کلیدی:** بطن چهارم، درد فرمالینی، گیرنده‌های اپیوئیدی، گیرنده‌های کانابینوئیدی، ویتامین ث

## مقدمه

واسطه‌گری می‌کنند، به ما برای فهم مکانیسم‌های درد و یافتن درمان‌های جدید بر اساس داروهای انتخابی‌تر و ترکیب‌های دارویی کمک می‌کند [۱].

ویتامین‌ها ترکیبات آلی هستند و بخش بزرگی از ریز مواد غذایی<sup>۱</sup> را تشکیل می‌دهند. ویتامین ث (اسید اسکوربیک) از ویتامین‌های محلول در آب بوده، و به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت، برای واکنش‌های سم‌زدایی و مبارزه علیه عفونت‌های باکتریایی ضروری است. این ویتامین در سراسر بدن از جمله مغز توزیع

درد در حیوانات به‌صورت یک حس ناسازگار و تجربه هیجانی نشان‌دهنده آگاه‌شدن حیوان از وجود یک آسیب یا عامل تهدیدکننده انسجام بافت‌ها تعریف شده است. پردازش درد از زمان تحریک گیرنده‌های درد تا رسیدن آن به مراکز عالی مغز در پنج مرحله شامل تبدیل، انتقال، تلفیق، تصویرشدن و پذیرش انجام می‌گیرد. مواد درون‌زاد از جمله پروستاگلاندین‌ها، هیستامین، گلوتامات، کانابینوئیدها و اپیوئیدها در پردازش همه مراحل مذکور شرکت می‌کنند. کشف سیستم‌های تنظیم‌کننده درد، محرک‌های حسی پیکری فعال‌کننده آن‌ها و میانجی‌های عصبی که عملکردهای آن‌ها را

<sup>1</sup> Micronutrients

[۸]. از طرف دیگر، اثرات مرکزی این ویتامین کمتر مورد توجه قرار گرفته است و مکانیسم‌های درگیر در اثرات ضد درد مرکزی آن تاکنون بررسی نشده است. در مطالعه حاضر، اثر تزریق ویتامین مذکور به داخل بطن چهارم بر درد فرمالینی کف پایی مورد ارزیابی قرار گرفته است. همچنین، برای بررسی نقش گیرنده‌های اپیوئیدی، از تزریق نالوکسون (آنتاگونیست گیرنده‌های اپیوئیدی) و AM251 (آنتاگونیست گیرنده‌های نوع ۱ کانابینوئیدی) پیش از تزریق داخل بطنی مغزی ویتامین ث استفاده شده است. لازم به ذکر است که اولاً اثرات تزریق داخل بطنی مغزی این ویتامین بر درد تاکنون بررسی نشده است و ثانیاً نقش گیرنده‌های اپیوئیدی و کانابینوئیدی در اثرات ضدردی مرکزی این ویتامین مورد ارزیابی قرار نگرفته است.

### مواد و روش‌ها

در این مطالعه، از موش‌های صحرایی (رت) بالغ نر سالم نژاد ویستار به وزن ۲۶۰ تا ۳۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات در این مطالعه در گروه‌های ۶ تایی در در قفس‌های پلی اتیلن در اتاق نگهداری موش‌های صحرایی آزمایشگاه فیزیولوژی در دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، با شرایط کنترل شده به صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و با دمای محیط  $22 \pm 0.5$  درجه سانتی‌گراد و با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. آزمایش‌ها بین ساعت ۱۲ تا ۱۷ انجام گرفت. اصول راهنمای نگهداری و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی (موسسه ملی سلامت ایالات متحده آمریکا) و قوانین مصوب بر اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی در دانشگاه ارومیه در همه مراحل نگهداری و انجام آزمایش روی موش‌های صحرایی رعایت گردید و با کد IR-UU-AEC-۳/پد/۱۹۲۲ مورد تایید کمیته اخلاق دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه قرار گرفت.

در این مطالعه، از ویتامین ث، نالوکسون هیدروکلراید و AM251، تهیه شده از شرکت دارویی سیگما - آلدريج<sup>۳</sup> آمریکا، استفاده شد. فرمالین ۲/۵ درصد از محلول فرمالین ۳۷/۵ درصد شرکت دارویی مرک<sup>۴</sup> آلمان تهیه شد. برای حل کردن AM251 از محلول ۵ درصد دی متیل سولفوکساید<sup>۵</sup>

می‌شود. در مغز، نورون‌ها و گلیاها برای برداشت ویتامین ث به مکانیسم‌های برداشت از طریق سیستم انتقال گلوکز و انتقال فعال زوج‌شده با سدیم متکی هستند، و بدین ترتیب غلظت بالایی از ویتامین ث در مغز ایجاد می‌شود. ویتامین ث علاوه بر نقش بسیار قوی آنتی‌اکسیدانسی، در فیزیولوژی سیستم عصبی دخالت می‌کند [۲]. ویتامین ث در پردازش مکانیسم‌های درد نیز دخالت می‌کند. تزریق داخل صفاقی ویتامین ث موجب کاهش درد و خیز ناشی از فرمالین و هیستامین در موش صحرایی می‌شود [۳]. نقش سیستم گلوتاماترژیک در اثر ضدردی ویتامین ث به دنبال تزریق داخل صفاقی گزارش شده است [۴]. با این حال، مکانیسم‌های مرکزی درگیر در اثر ضدردی ویتامین ث تاکنون بررسی نشده است.

آزمون درد فرمالینی یکی از متداولترین روش‌های بررسی مکانیسم‌های محیطی و مرکزی درد است. با تزریق محلول‌های رقیق فرمالین به عنوان یک ماده درازا به نواحی مختلف بدن به ویژه کف پا رفتارهای درد به صورت دو مرحله‌ای با یک مرحله سکون (اینترفاز) بین دو مرحله گزارش شده است. مطرح شده است که مرحله اول به علت تحریک مستقیم گیرنده‌های درد و مرحله دوم به علت اثر انواع مختلف میانجی‌های التهابی و متعاقباً انتقال پیام‌های درد به نخاع و مراکز مغزی ایجاد می‌شوند. از طرف دیگر، مطرح شده است که التهاب به تنهایی قادر به ایجاد پاسخ‌های مرحله دوم نمی‌باشد و عوامل دیگری مانند روندهای ایجاد شده در نخاع نیز در ایجاد واکنش‌های مربوط به مرحله دوم نقش دارند [۵، ۶].

مطالعات متعدد مشخص کرده‌اند که اپیوئیدها و کانابینوئیدها اثرات ضدردی دارند. اپیوئیدها و کانابینوئیدها دارای محل‌های اثر متعددی برای ایجاد اثرات ضدردی در محیط، نخاع و مغز می‌باشند [۱]. فعال شدن گیرنده‌های مذکور در نواحی مختلف از مسیرهای پردازش کننده درد از جمله ماده خاکستری دور قنات<sup>۲</sup> که بخشی از سیستم نزولی تنظیم کننده درد است، سبب ایجاد اثرات ضدردی می‌شود [۷، ۱].

اگرچه اثر ضدردی تزریق سیستمیک ویتامین ث در برخی از مطالعات مطرح شده است، در برخی دیگر از مطالعات تجویز سیستمیک ویتامین ث نتوانسته سبب کاهش پاسخ درد شود

<sup>2</sup> Periaqueductal gray

<sup>3</sup> Sigma-Aldrich

<sup>4</sup> Merck

<sup>5</sup> DMSO

پنج دقیقه قبل از تزریق داخل بطن چهارم ویتامین ث (۴۰ میلی گرم در ۲ میکرولیتر) انجام گرفت. محلول‌های دارویی به داخل بطن چهارم در حجم ۲ میکرولیتر و در مدت زمان تزریق ۶۰ ثانیه تزریق شدند و به منظور انتشار محلول دارویی در بطن چهارم، ۶۰ ثانیه دیگر سر سوزن در داخل کانول ماند. تزریق داخل بطن چهارم ویتامین ث ۵ دقیقه قبل از ایجاد درد انجام شد. مقادیر استفاده شده از داروها در مطالعه حاضر نزدیک به مقادیری هستند که سایر محققین استفاده کرده‌اند [۱۱، ۱۲].

برای ایجاد درد فرمالینی، ابتدا موش‌ها در داخل جعبه‌هایی از جنس شیشه نشکن (شرکت رازی راد، تهران) به ابعاد ۲۵ × ۲۵ سانتی‌متر قرار داده شدند. جعبه‌ها بر روی یک چهارچوب‌هایی از جنس شیشه نشکن و دارای یک آینه با زاویه ۴۵ درجه گذاشته شدند. نیم ساعت پس از سازگاری، حیوان به آرامی مقید و به وسیله سر سوزن شماره ۳۰ میزان ۵۰ میکرولیتر از محلول فرمالین با غلظت ۲/۵ درصد به ناحیه زیر پوست کف پا تزریق گردید. بلافاصله پس از تزریق حیوان به داخل جعبه برگردانده شد و پاسخ حیوان به صورت مدت زمان لیسیدن و گاز گرفتن ناحیه تزریق شده پس از تزریق فرمالین در فواصل زمانی پنج دقیقه‌ای برای مدت ۶۰ دقیقه ثبت شد. در مطالعه حاضر، رفتار حیوان در فواصل زمانی صفر تا ۵ دقیقه و ۱۵ تا ۵۰ دقیقه به ترتیب به عنوان مراحل اول و دوم درد در نظر گرفته شد.

همه حیوانات دریافت‌کننده داروهای به کار برده شده در این مطالعه در حدود ۷ روز پس از اتمام مطالعه درد برای فعالیت حرکتی استفاده شدند. ثبت فعالیت حرکتی با استفاده از جعبه فعالیت الکتریکی (برج صنعت تهران، ایران) انجام شد. این دستگاه از یک پلکسی گلاس (۳۰ × ۳۰ × ۳۰) ساخته شده است. به منظور ارزیابی فعالیت حرکتی، پس از تزریق مجدد داروهای مورد استفاده با فاصله‌های زمانی ذکر شده، هر حیوان به طور جداگانه در یک از گوشه این جعبه قرار گرفت. میزان فعالیت حرکتی حیوان باعث شکست پرتوهای نور شد و نمایشگر دستگاه تعداد شکست پرتوهای نور را در ۵ دقیقه نشان داد.

در پایان هر آزمایش با تزریق ۲ میکرولیتر متیلن بلو به داخل بطن چهارم موش‌های صحرایی بی‌هوش شده، و پس از آسان‌کشی، مغزها خارج شدند و در محلول فرمالین ۱۰٪ قرار داده شدند. بعد از ۴۸ ساعت، مغزها به صورت عرضی مقطع زده

استفاده گردید [۹]. برای تهیه و رقیق نمودن دیگر محلول‌های دارویی از سالین نرمال استریل استفاده شد. محلول‌های دارویی نیم ساعت قبل از تزریقات تهیه شدند.

به منظور تزریق داخل بطنی مغزی محلول‌های دارویی، در هر حیوان یک عدد کانول راهنمای استانلیس استیل در بطن چهارم قرار داده شد. برای قراردادن کانول، هر کدام از موش‌ها با تزریق داخل صفاقی مخلوطی از کتامین (۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و گزیلازین (۸ میلی گرم بر کیلوگرم) بیهوش و سر حیوان در داخل دستگاه استرئوتاکسی<sup>۶</sup> و سر حیوان در داخل دستگاه استرئوتاکسی<sup>۶</sup> (Stoelting, Wood Lane, IL, USA) ثابت شد. پس از ایجاد یک شکاف طولی بین زوایای خلفی چشم‌ها به طرف عقب سر، پوست از بافت‌های همبند زیر آن جدا و ناحیه جراحی با استفاده از قلاب در معرض دید قرار گرفت. برای مشخص شدن برگما (محل اتصالی استخوان‌های آهیانه و پیشانی) ضریع روی استخوان‌ها با استفاده از ضریع تراش تراشیده شد. سپس با علامت‌گذاری بر روی مختصات محل بطن چهارم در سطح جمجمه (۱۱/۵ میلی متر به طرف خلف برگما)، یک سوراخ به قطر یک میلی متر برای قرار دادن کانول و دو سوراخ دیگر به منظور بستن پیچ ریز ایجاد گردید. کانول استانلیس استیل شماره ۲۳ و به طول ۱۵ میلی متر به محور عمودی دستگاه متصل و از سطح سوراخ استخوان جمجمه تا عمق ۷/۱ میلی متری مغز در داخل بطن چهارم قرار داده شد [۱۰]. دور کانول و پیچ‌ها با سیمان دندانپزشکی پر شد. یک عدد سیم استانلیس استیل هم قطر با قطر داخلی کانول‌های راهنما به عنوان استابیل<sup>۷</sup> در داخل کانول قرار داده شد. پس از بخیه زدن پوست، به حیوانات مقدار ۱۰۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم پنی سیلین همراه یک صدم گرم استرپتومایسین به روش داخل عضلانی تزریق شد. تا قبل از شروع تزریقات داخل بطنی مغزی، یک دوره استراحت ۱۰ روزه به حیوانات داده شد.

برای تزریق سالین نرمال (کنترل)، ویتامین ث (۰/۶۳، ۲/۵، ۱۰ و ۴۰ میکروگرم در ۲ میکرولیتر)، نالوکسون (۰/۵ و ۲ میکروگرم) و AM251 (۱ و ۴ میکروگرم) از روش تزریق داخل بطنی مغزی با استفاده از سرسوزن تزریقی شماره ۳۰ استفاده شد که با یک لوله پلی اتیلنی به سرنگ هامیلتون ۵ میکرولیتری متصل شده بود. تزریق نالوکسون و AM251

<sup>6</sup> Stereotaxic apparatus

<sup>7</sup> Stylet

اثر تزریق داخل بطن چهارم ویتامین ث بر مراحل درد فرمالینی کف پای در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است. تزریق ویتامین ث در مقدار ۰/۶۳ و ۲/۵ میکروگرم به بطن چهارم اثر معنی داری بر روی واکنش درد فرمالینی نداشت. تزریق داخل بطنی مغزی ویتامین ث در مقدار ۱۰ و ۴۰ میکروگرم به طور معنی داری در مرحله اول ( $F [۴,۲۹] = ۱۴/۲۹$   $p < ۰/۰۱$ ) و مرحله دوم ( $F [۴,۲۹] = ۱۷/۹۹$   $p < ۰/۰۱$ ) درد را کاهش داد.

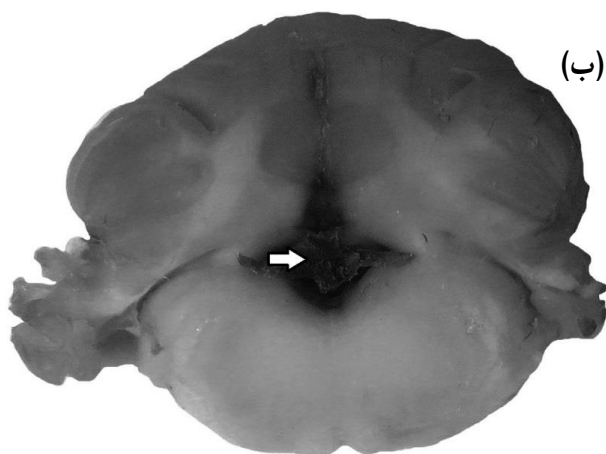
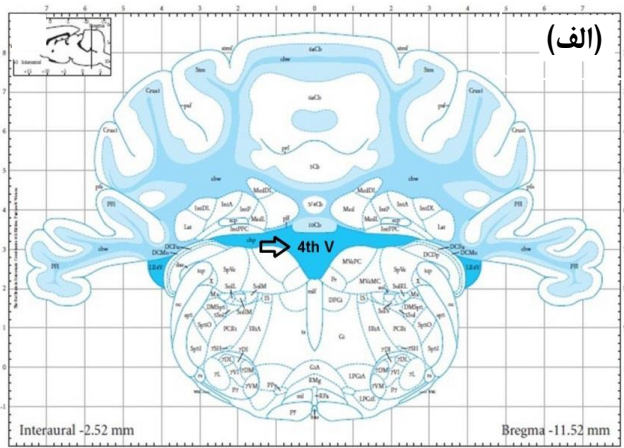
نمودار شماره ۳ اثر پیش تزریق نالوکسون قبل از تزریق ویتامین ث به داخل بطن چهارم بر کاهش درد فرمالینی ناشی از ویتامین ث را نشان می دهد. تزریق به تنهایی نالوکسون در مقادیر ۰/۵ و ۲ میکروگرم به داخل بطن چهارم تغییر معنی داری در میزان شدت درد فرمالینی ایجاد نکرد. از طرف دیگر،

شدند (۵۰-۱۰۰ میکرومتر) و در زیر لوپ به منظور مشاهده توزیع متیلن بلو در بطن چهارم مطابق با اطلس پاکسینوس و واتسون بررسی شدند [۱۰]. داده های مربوط به قرار نگرفتن صحیح کانول ها در بطن چهارم از تجزیه و تحلیل آماری حذف شدند.

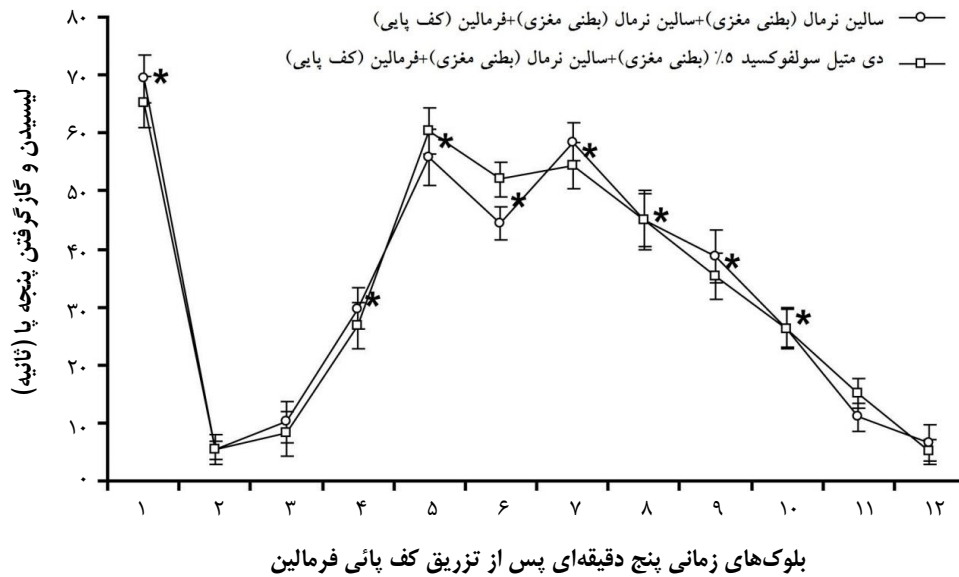
برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار گراف پد پریسم نسخه ۵ استفاده گردید. داده های حاصل از تزریق زیرجلدی فرمالین در ناحیه کف پا با روش آماری آنالیز واریانس (ANOVA) دوطرفه و سپس آزمون تعقیبی بنفرونی و داده های حاصل از تزریق داخل بطنی مغزی سالین نرمال (کنترل) و محلول های دارویی با روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه و سپس آزمون توکی تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی دار،  $p < ۰/۰۵$  در نظر گرفته شد.

## یافته ها

در تصویر شماره الف موقعیت بطن چهارم، از اطلس مغز موش صحرائی استخراج شده است [۱۰]. تصویر شماره ب موقعیت بطن چهارم را در مطالعه حاضر نشان می دهد. نمودار شماره ۱ منحنی های مربوط به پاسخ درد در دو گروه از موش های صحرائی به ترتیب پس از دو تزریق داخل بطنی مغزی متوالی از سالین نرمال به فاصله زمانی ۵ دقیقه و نیز تزریق داخل بطنی مغزی محلول پنج درصد DMSO با سالین نرمال به فاصله زمانی ۵ دقیقه را قبل از تزریق زیرجلدی فرمالین به ناحیه کف پای موش صحرائی نشان می دهد. در هر دو گروه متعاقب تزریق کف پای موش صحرائی نشان می دهد. در هر میکرولیتر رفتارهای درد بسیار شدیدی به صورت لیسیدن و گازگرفتن پنجه پا ایجاد شد و مدت زمان لیسیدن و گازگرفتن پنجه پا در پنج دقیقه های اول و چهارم تا دهم نسبت به پنج دقیقه های دوم، سوم، یازدهم و دوازدهم افزایش معنی دار ( $p < ۰/۰۱$ ) نشان داد. به عبارت دیگر به دنبال تزریق کف پای فرمالین پاسخ های درد شامل لیسیدن و گازگرفتن به صورت دو مرحله ای (مرحله اول: دقایق صفر تا ۵ و مرحله دوم: دقایق ۱۵ تا ۵۰) ایجاد شدند. تحلیل آماری با روش ANOVA دوطرفه و سپس آزمون تعقیبی بنفرونی اختلاف معنی داری بین گروه های دریافت کننده داخل بطنی مغزی سالین نرمال و DMSO نشان نداد. به این ترتیب گروه دریافت کننده سالین نرمال به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد.



**تصویر ۱ -** مقاطع عرضی از مغز موش صحرائی. (الف) از اطلس مغز موش [۱۰] اقتباس شده است و موقعیت بطن چهارم مغز (4<sup>th</sup> V) با پیکان نشان داده شده است. (ب) محل تزریق به بطن چهارم در مطالعه حاضر با پیکان مشخص شده است.



بلوک‌های زمانی پنج دقیقه‌ای پس از تزریق کف پائی فرمالین

**نمودار ۱-** پاسخ‌های درد شامل لیسیدن و گازگرفتن پنجه پا به دنبال تزریقات داخل بطنی مغزی دو تزریق سالیین نرمال و تزریق دی‌متیل‌سولفوکساید پنج درصد با سالیین نرمال قبل از تزریق کف پائی فرمالین در موش‌های صحرایی. نقاط نشان‌دهنده میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین هستند. تعداد حیوان در هر گروه شش سر موش صحرایی می‌باشد. \* نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.05$  در هر دو گروه بین پنج دقیقه‌های اول و چهارم تا دهم با پنج دقیقه‌های دوم، سوم، یازدهم و دوازدهم در داخل گروه‌های دریافت‌کننده سالیین نرمال و دی‌متیل‌سولفوکساید پنج درصد می‌باشد اما بین این دو گروه تفاوت معنی‌دار مشاهده نگردید.

## بحث

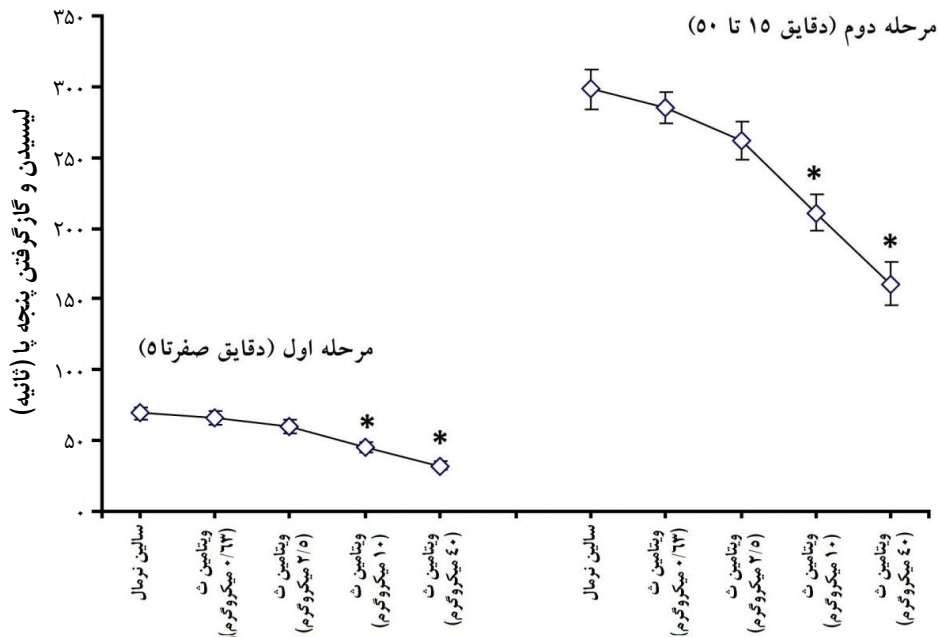
نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تزریق زیر جلدی فرمالین به ناحیه کف پای موش صحرایی یک رفتار دو مرحله‌ای مشخص ایجاد می‌کند که این پاسخ‌های رفتاری شامل لیسیدن و گازگرفتن متوالی پنجه پای تزریق شده می‌باشد. از محلول‌های رقیق فرمالین (۲٪ تا ۱۰٪) به‌عنوان یک ماده دردآور به‌منظور بررسی مکانیسم‌های درد تونیک با تزریق به نواحی مختلف بدن به‌ویژه کف پا و ناحیه صورت به کرات استفاده و رفتارهای درد را به صورت دو مرحله‌ای با یک مرحله سکون (اینترفاز) بین دو مرحله گزارش کرده‌اند. در این راستا، بیان شده که مرحله اول درد فرمالینی عموماً توسط فعال شدن مستقیم فیبرهای C و از طریق فعال شدن گیرنده‌های  $TRPA_1$  بر روی این نوسیسپتورها و مرحله دوم با تحریک مداوم نوسیسپتورها توسط واسطه‌های التهابی و تغییراتی در نخاع و مراکز مغزی، مثلاً افزایش بیان c-FOS و فعال شدن میکروگلیاها در نخاع، به‌وجود می‌آید [۱۵-۱۳، ۶].

تزریق نالوکسون با مقدار ۲ میکروگرم قبل از تزریق داخل بطنی مغزی ویتامین ث با مقدار ۴۰ میکروگرم، اثر ضدردی ایجاد شده توسط ویتامین ث را در مرحله اول (F [۴،۲۹] = ۱۵/۹۷،  $p < 0.01$ ) و مرحله دوم (F [۴،۲۹] = ۱۵/۷۷،  $p < 0.01$ ) درد فرمالینی مهار کرد.

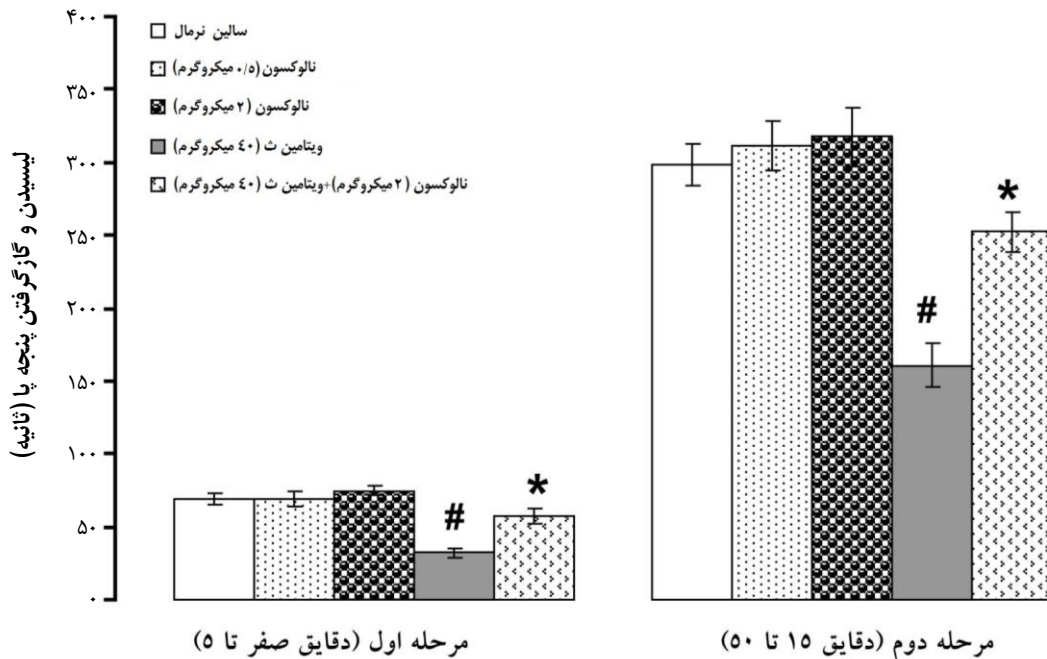
نمودار شماره ۴ اثر پیش تزریق AM251 قبل از تزریق ویتامین ث به داخل بطن چهارم بر کاهش درد فرمالینی ناشی از ویتامین ث را نشان می‌دهد. شدت درد فرمالینی متعاقب تزریق به‌تنهایی AM251 در مقادیر ۱ و ۴ میکروگرم به‌داخل بطن چهارم تغییر نکرد؛ اما، تزریق AM251 (۴ میکروگرم) قبل از تزریق داخل بطنی مغزی ویتامین ث با مقدار ۴۰ میکروگرم، از اثرات ضدردی ایجادشده توسط ویتامین ث در مرحله اول (F [۴،۲۹] = ۲۱/۱۶،  $p < 0.01$ ) و مرحله دوم (F [۴،۲۹] = ۱۵/۳۴،  $p < 0.01$ ) درد فرمالینی جلوگیری کرد.

تعداد شکست پرتوهای نور در ۵ دقیقه در گروه دریافت‌کننده سالیین نرمال  $4/77 \pm 85/5$  بود. تزریق داخل بطنی مغزی ویتامین ث و نیز تزریق توام داروها در مقایسه با گروه دریافت‌کننده سالیین نرمال تغییر معنی‌داری در تعداد قطع اشعه در جعبه فعالیت الکتریکی ایجاد نکردند (داده‌ها نشان داده نشده است).

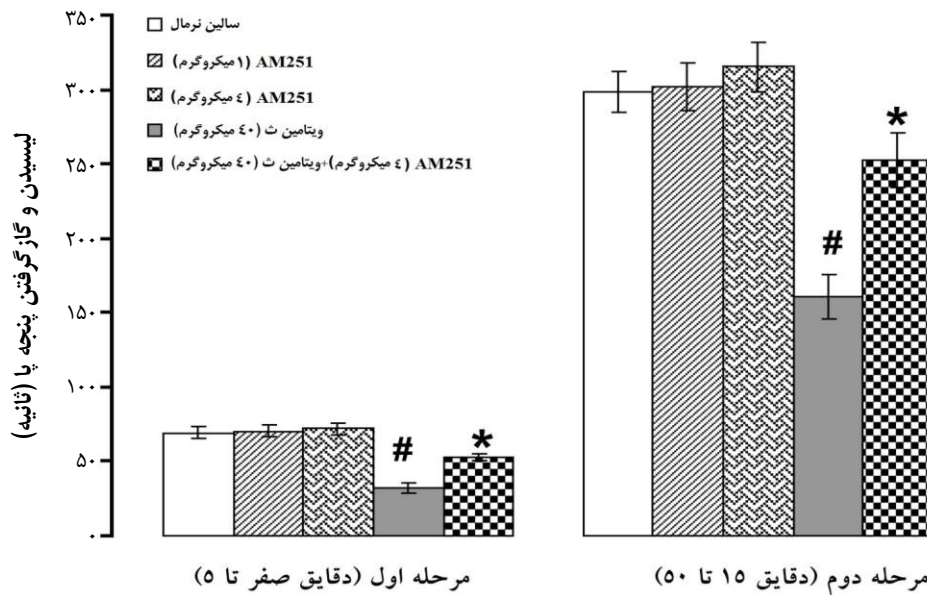
<sup>8</sup> Transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1



**نمودار ۲-** اثر تزریق ویتامین ث به داخل بطن چهارم بر پاسخ‌های درد شامل لیسیدن و گازگرفتن پنجه پا به دنبال تزریق کف پائی فرمالین در موش‌های صحرائی. نقاط نشان‌دهنده میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین هستند. تعداد حیوان در هر گروه شش سر موش صحرائی می‌باشد. \* نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح  $p < 0/01$  با گروه دریافت‌کننده سالین نرمال می‌باشد.



**نمودار ۳-** اثر تزریق نالوکسون به تنهایی و قبل از تزریق ویتامین ث (۴۰ میکروگرم) به داخل بطن چهارم بر پاسخ‌های درد شامل لیسیدن و گازگرفتن پنجه پای ناشی از تزریق فرمالین در موش‌های صحرائی. نقاط نشان‌دهنده میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین هستند. تعداد حیوان در هر گروه شش سر موش صحرائی می‌باشد. \* نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح  $p < 0/01$  با گروه دریافت‌کننده ویتامین ث (۴۰ میکروگرم) می‌باشد. # نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح  $p < 0/01$  با گروه دریافت‌کننده نرمال سالین می‌باشد.



**نمودار ۴-** اثر تزریق AM251 به تنهایی و قبل از تزریق ویتامین ث (۴۰ میکروگرم) به داخل بطن چهارم بر پاسخ های درد شامل لیسیدن و گازگرفتن پنجه پای ناشی از تزریق فرمالین در موش های صحرایی. نقاط نشان دهنده میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین هستند. تعداد حیوان در هر گروه شش سر موش صحرایی می باشد. \*: نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح  $p < 0.01$  با گروه دریافت کننده ویتامین ث (۴۰ میکروگرم) می باشد. #: نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح  $p < 0.01$  با گروه دریافت کننده نرمال سالین می باشد.

ویتامین ث می تواند باعث کاهش درد و التهاب ناشی از فرمالین و هیستامین در موش صحرایی شود [۶]. زراعتی و همکاران (۲۰۱۴) نیز اثر ضددردی وابسته به دز ویتامین ث را در درد احشایی در موش سفید کوچک آزمایشگاهی گزارش کرده اند [۲۰]. از طرف دیگر، در برخی از مطالعات در موش سفید کوچک آزمایشگاهی تزریق محیطی ویتامین ث به تنهایی نتوانسته است در مدل های درد نوروپاتی و فرمالینی اثر ضددردی داشته باشد ولی در تزریق توام با ویتامین E اثر ضددردی داشته است [۸]. با این حال، تاکنون از اثرات مرکزی این ویتامین بر درد فرمالینی گزارشی ارائه نشده است.

از طرف دیگر، در مطالعه حاضر پیش تزریق نالوکسون توانست اثر ضددردی ایجاد شده توسط ویتامین ث به دنبال تزریق داخل بطن چهارم را مهار کند. نالوکسون آنتاگونیست رقابتی گیرنده های اپیوئیدی مو و کاپا است که گرایش بیشتری نسبت به گیرنده های مو دارد [۲۱]. نالوکسون به طور مکرر برای ارزیابی مشارکت سیستم اپیوئیدی در تنظیم درد و خاصیت ضددردی استفاده شده است. تاکنون گزارشی مبنی بر اثر مهاری نالوکسون بر کاهش درد ناشی از ویتامین ث گزارش نشده است؛ ولی مطرح شده است که نالوکسون می تواند بر

این بررسی نیز تزریق فرمالین ۲/۵ درصد به ناحیه کف پای موش های صحرایی موجب ایجاد درد دومرحله ای شد که با نتایج به دست آمده از مطالعات سایر محققان همخوانی دارد.

در مطالعه حاضر تزریق داخل بطنی مغزی ویتامین ث باعث کاهش پاسخ درد در مرحله اول و دوم آزمون فرمالین ناحیه کف پای شد. دردهای عضلانی اسکلتی یکی از ویژگی های کمبود ویتامین ث در بیماری اسکوروی می باشد [۱۶]. همچنین، شواهد رو به افزایش نشان می دهند که تجویز ویتامین ث به علت دارابودن ویژگی های تنظیم کننده عصبی و آنتی اکسیدانتی می تواند نقش مهمی در تخفیف درد داشته باشد [۱۷]. بیان شده است که ویتامین ث سیستمیک، به تنهایی و در ترکیب با ویتامین E، درد نوروپاتی ایجاد شده توسط ضایعه تنگی مزمن عصب سیاتیک در موش صحرایی را کاهش می دهد [۱۸]. همچنین ویتامین ث اثر ضددردی گاباپنتین را در درد نوروپاتی افزایش داده است [۱۹]. نشان داده شده که اثر ضددردی ویتامین ث سیستمیک بر درد فرمالینی کف پای در موش سفید کوچک آزمایشگاهی از طریق یک مکانیسم گلوتاماترژیک واسطه گری می شود [۴]. همچنین، تمدن فرد و عرفان پرست (۱۳۸۸) گزارش کرده اند که تزریق داخل صفاقی

برای مدیریت بهتر درد و راهکارهای کاهش درد توسط ضددردها مفید است. در مطالعات متعددی اثر ضددردی ویتامین ث مطرح شده است. با این وجود، مکانیسم مرکزی ایجادکننده بی‌دردی توسط این ویتامین هنوز به‌طور دقیق مشخص نیست. به‌علت نقش نخاع و مراکز بالاتر در درد فرمالینی و همچنین نقش سیستم‌های اپیوئیدی و کانابینوئیدی در پردازش درد، احتمال دارد که اثر ضددردی ویتامین ث با فعال کردن این سیستم‌ها در سطح نخاع و یا مراکز بالاتر باشد.

### سپاسگزاری

از حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه برای انجام این تحقیق سپاسگزاری می‌شود.

### ملاحظات مالی

این کار با حمایت مالی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه انجام گرفته است.

### تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

### نقش نویسندگان

ا.ع.: ایده و طراحی مطالعه، نظارت بر انجام مطالعه، آنالیز داده‌ها و نگارش مقاله؛ ا.ت.: ایده و طراحی مطالعه، نظارت بر انجام مطالعه، مشاوره در آنالیز داده‌ها و اصلاح مقاله؛ س.ت.: انجام مطالعه و جمع‌آوری داده‌ها، اصلاح مقاله؛ س.ت.، ی.ا.، ر.د. و د.ر.: انجام مطالعه و جمع‌آوری داده‌ها.

### فهرست منابع

- [1] McMahon SB, Koltzenburg M, Tracey I, Turk D, Wall and Melzack's textbook of pain. 6th ed. Elsevier Health Sciences, 2013.
- [2] Ballaz SJ, Rebec GV, Neurobiology of vitamin C: Expanding the focus from antioxidant to endogenous neuromodulator. *Pharmacol Res* 146 (2019) 104321.
- [3] Tamaddonfard E, Erfanparast A, The effect of intraperitoneal injection of vitamin C on the pain and edema induced by formalin and histamine in rats. *Iran Vet J* (2009) 15-24 [in Persian].

روی آزادسازی اسید اسکوربیک در هسته اکومبیس اثر مهاری داشته باشد [۲۲]. از طرف دیگر، تداخل اثر ضددردی اسکوربیک اسید با مرفین و ترامادول در درد احشایی گزارش شده است [۲۰].

در مطالعه حاضر، پیش تزریق AM251 توانست اثر ضددردی ایجاد شده توسط تزریق داخل بطن چهارم ویتامین ث را مهار کند. AM251 آنتاگونیست گیرنده‌های کانابینوئیدی نوع ۱ (CB1) است که در مطالعات متعددی مورد استفاده قرار گرفته است [۲۳، ۹]. کانابینوئیدها اثرات بیولوژیکی خود را از طریق اتصال به گیرنده‌های CB1 و CB2 کانابینوئیدی میانجیگری می‌کنند. گیرنده‌های CB2 عمدتاً در سیستم ایمنی واقع شده، ولی گیرنده‌های CB1 اساساً در سیستم عصبی و به‌ویژه با غلظت بالا در مغز یافت می‌شوند [۲۴]. اثرات ضددردی کانابینوئیدها را به فعال شدن گیرنده‌های CB1 مرکزی، گیرنده‌های CB2 در سلول‌های ایمنی محیطی و تداخل اثر با سیستم‌های دیگر نسبت داده‌اند [۲۵، ۲۴]. درباره نقش گیرنده‌های کانابینوئیدی در اثر ضددردی ایجادشده توسط ویتامین ث مطالعه‌ای موجود نیست.

در مطالعه حاضر، تزریق به‌تنهایی و توأم داروها هیچ اثری بر فعالیت حرکتی نداشتند. به‌عبارت‌دیگر، در مقادیر مصرف شده از داروهای ذکر شده هیچ اختلالی در فعالیت حرکتی به علت آرام‌بخشی (کاهش فعالیت) و یا حساس شدن (افزایش فعالیت) مشاهده نشد.

### نتیجه‌گیری

اثر ضددردی ایجاد شده با تجویز مرکزی ویتامین ث که در مطالعه حاضر مشاهده شد، به‌علت اثر ویتامین مذکور بر مراکز تعدیل درد می‌باشد. شناخت راه‌های مرکزی پردازش‌کننده درد

- [4] Rosa KA, Gadotti VM, Rosa AO, Rodrigues ALS, Calixto JB, Santos AR, Evidence for the involvement of glutamatergic system in the antinociceptive effect of ascorbic acid. *Neurosci Lett* 381 (2005) 185-188.
- [5] Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland GH, Hole K, The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51 (1992) 5-17.
- [6] Porro CA, Cavazzuti M, Spatial and temporal aspects of spinal cord and brainstem activation in the formalin pain model. *Prog Neurobiol* 41 (1993) 565-607.
- [7] Wilson-Poe, AR, Morgan MM, Aicher SA, Hegarty DM, Distribution of CB1 cannabinoid receptors and their relationship with mu-opioid receptors in the rat



- periaqueductal gray. *Neuroscience* 213 (2012) 191-200.
- [8] Lu R, Kallenborn-Gerhardt W, Geisslinger G, Schmidtko A, Additive antinociceptive effects of a combination of vitamin C and vitamin E after peripheral nerve injury. *PLoS One* 6 (2011) e29240.
- [9] Tamaddonfard E, Erfanparast A, Salighedar R, Tamaddonfard S, Medial prefrontal cortex diclofenac-induced antinociception is mediated through GPR55, cannabinoid CB1, and mu-opioid receptors of this area and periaqueductal gray. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 393 (2020) 371-379.
- [10] Paxinos G, Watson C, The rat brain in stereotaxic coordinates. 7th ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2018.
- [11] Giusti-Paiva A, Domingues VG, Centrally administered ascorbic acid induces antidiuresis, natriuresis and neurohypophyseal hormone release in rats. *Neuro Endocrinol Lett* 31 (2010) 87-91.
- [12] Galdino G, Romero TR, Silva JFP, Aguiar DC, de Paula AM, Cruz JS, Parrella C, Piscitelli F, Duarte ID, Di Marzo, V, Perez AC, The endocannabinoid system mediates aerobic exercise-induced antinociception in rats. *Neuropharmacology* 77 (2014) 313-324.
- [13] McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, Hayward NJ, Chong JA, Julius D, Moran MM, Fanger CM, TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Nat Acad Sci USA* 104 (2007) 13525-13530.
- [14] Sawynok J, Liu XJ, The formalin test: characteristics and usefulness of the model. *Rev Analgesia* 7 (2003) 45-163.
- [15] Martindale J, Bland-Ward PA, Chessell IP, Inhibition of C-fibre mediated sensory transmission in the rat following intraplantar formalin. *Neurosci Lett* 316 (2001) 33-36.
- [16] Carr AC, McCall C, The role of vitamin C in the treatment of pain: new insights. *J Transl Med* 15 (2017) 1-14.
- [17] Chaitanya, NC, Muthukrishnan A, Krishnaprasad CMS, Sanjuprasanna G, Pillay P, Mounika B, An insight and update on the analgesic properties of vitamin C. *J Pharm Bioallied Sci* 10 (2018) 119-125.
- [18] Riffel APK, de Souza JA, Maria do Carmo QS, Horst A, Scheid T, Kolberg C, Belló-Klein A, Partata WA, Systemic administration of vitamins C and E attenuates nociception induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Brain Res Bulletin* 121 (2016) 169-177.
- [19] Li R, Shen L, Yu X, Ma C, Huang Y, Vitamin C enhances the analgesic effect of gabapentin on rats with neuropathic pain. *Life Sci* 157 (2016) 25-31.
- [20] Zeraati F, Araghchian M, Farjoo MH, Ascorbic Acid interaction with analgesic effect of morphine and tramadol in mice. *Anesth Pain Med* 4 (2014) e19529.
- [21] Helm S, Trescot AM, Colson J, Sehgal N, Silverman S, Opioid antagonists, partial agonists, and agonists/antagonists: the role of office-based detoxification. *Pain Physician* 11 (2008) 225-235.
- [22] Sun JY, Yang JY, Wang F, Wang JY, Song W, Su GY, Dong YX, Wu CF, Lesions of nucleus accumbens affect morphine-induced release of ascorbic acid and GABA but not of glutamate in rats. *Addict Biol* 16 (2011) 540-550.
- [23] Katsuyama S, Mizoguchi H, Komatsu T, Nagaoka K, Sakurada S, Sakurada T, The cannabinoid 1 receptor antagonist AM251 produces nociceptive behavior via activation of ERK signaling pathway. *Neuropharmacology* 59 (2010) 534-541.
- [24] Wolf J, Urits I, Orhurhu V, Peck J, Orhurhu MS, Giacomazzi S, Smoots D, Piermarini C, Manchikanti L, Kaye AD, Kaye RJ, The role of the cannabinoid system in pain control: basic and clinical implications. *Curr Pain Headache Rep* 24 (2020) 1-11.
- [25] Vučković S, Srebro D, Vujović KS, Vučetić Č, Prostran M, Cannabinoids and pain: new insights from old molecules. *Front Pharmacol* 9 (2018) 1259.

## Research paper

## Opioid and CB1 receptors involvement in central anti-nociceptive effect of vitamin C in the formalin-induced pain model in rats

Amir Erfanparast\*, Esmaeel Tamaddonfard, Sina Tamaddonfard,  
Yasin Esmaeilou, Raziye Daneshyar, Dorsa Raissian

*Department of Physiology, Group of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran*

Received: 30 December 2021

Accepted: 5 January 2022

## Abstract

**Background and Aim:** Although the analgesic effect of vitamin C was reported in several studies, its supra-spinal analgesia and the involved mechanisms have not been investigated yet. In this study, central effect of vitamin C in formalin-induced pain was investigated. Naloxone (an opioid receptor antagonist) and AM251 (a CB1 receptor antagonist) were used to clarify the possible mechanism of this vitamin.

**Methods:** In ketamine-xylazine anesthetized rats, one stainless-steel guide cannula was implanted into the fourth ventricle of the brain. The formalin test was induced by intra-plantar injection of formalin (50  $\mu$ L, 2.5%), and the time spent licking and biting of the injected paw was recorded for 1 h.

**Results:** A marked biphasic (first phase: 0–5 min and second phase: 15–50 min) pain response was induced after formalin injection. Intra-fourth ventricle injection of vitamin C significantly ( $p < 0.05$ ) decreased both phases of pain. Naloxone and AM251 had no effect on the pain intensity. However, the analgesic effect of vitamin C was inhibited by pretreatments with naloxone and AM251. All the above-mentioned treatments did not alter locomotor activity of the animals.

**Conclusion:** These results showed that vitamin C suppresses formalin-induced neurogenic and inflammatory pains in rats through central modulatory mechanisms. Opioid and cannabinoid receptors play a role in the analgesic effects of vitamin C.

**Keywords:** Cannabinoid receptors, Formalin pain, Fourth ventricle, Vitamin C, Opioid receptor

Please cite this article as follows:

Erfanparast A, Tamaddonfard E, Tamaddonfard S, Esmaeilou Y, Daneshyar R, Raissian D, Pashaei S, Opioid and CB1 receptor involvement in central anti-nociceptive effect of vitamin C in the formalin-induced pain model in rats. *Iran J Physiol Pharmacol* 5 (2022) 223-232.

\*Corresponding author: a.erfanparast@urmia.ac.com, erfandparast@gmail.com (ORCID ID: 0000-0003-2526-2253)