

بررسی اثر ضد دردی اسید آسکوربیک و نقش سیستم نیتریک اکسید در یک مدل درد مزمن

فریناز نصیری نژاد^{۱*}، سپیده صفارپور^۲

^۱مرکز تحقیقات فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایران* تهران، ایران. ^۲گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۸۸/۵/۱۳، تاریخ پذیرش: ۸۹/۴/۲۲

Antinociceptive effect of ascorbic acid and involvement of nitric oxide in a chronic pain model

Nasirinezhad F.^{*1}, Safarpour S.²

¹Physiological research center, Physiology department, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

²Physiology department, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 4Aug. 2009, Accepted: 13Jul. 2010

Objectives: Ascorbate which is presented in high concentration in nervous system, inhibit nitric oxide synthase enzyme (NOS). We investigated the involvement of NO pathway in the analgesic effects of ascorbic acid (AA) in CCI model of neuropathic rats. **Methods:** In this experimental study, neuropathic pain is induced by 4 loose ligature around sciatic nerve on left paw of male rats using 4/0 chromic gut (CCI model). Ascorbic acid (1, 5 or 10 mg/kg) or saline was injected intraperitoneally two weeks after CCI. Heat and mechanical hyperalgesia and mechanical allodynia were investigated 15 and 30 min after injection. To investigate the involvement of NO on antinociceptive effect of AA on the second week after CCI, 30 min after injection of saline or AA, animals received intraperitoneally injection of L-arginin (500 mg/kg), or L-NAME (20mg/kg) and were tested 20 min after on. **Results:** Acute injection of 5 and 10 mg/kg but not 1 mg/kg of AA increased pain threshold in the second week after CCI. Injection of 5 mg/kg AA inhibited the nociceptive effect of L-arginin and potentiates the antinociceptive effect of L-NAME and pain threshold was significantly different in these two groups comparing the animals which received normal saline instead of AA. **Conclusion:** Injection of AA increase pain threshold after nerve injury. Antinociceptive effect of ascorbic acid is dose dependant and that seems to be mediated at least partially via NO pathway.

Keywords: Ascorbic acid, nitric oxide, neuropathic pain

زمینه و هدف: آسکوربات یک تنظیم کننده عصبی بوده و قادر به مهار آنزیم سازنده نیتریک اکسید (NOS) می باشد. در این مطالعه نقش مسیر نیتریک اکساید (NO) در اثرات ضد دردی اسید آسکوربیک (AA) مورد بررسی قرار گرفته است. روش ها: در این مطالعه تجربی، جهت ایجاد درد عصب سیاتیک در پای چپ موش های صحرایی نر توسط ۴ گره شل بوسیله نخ بخیه ۰/۴ تحت فشار قرار گرفت (مدل CCI). دو هفته پس از CCI، حیوانات ۱، ۵ یا ۱۰ mg/kg اسید آسکوربیک و یا نرمال سالین دریافت کردند و ۱۵ و ۳۰ دقیقه پس از آن هیپرالژیای حرارتی و مکانیکی و همچنین آلودینیای مکانیکی مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت بررسی نقش NO در هفته دوم پس از CCI، ۳۰ دقیقه بعد از تزریق AA و یا نرمال سالین، L-arginine (۵۰۰ mg/kg) و یا L-NAME (۲۰ mg/kg) به صورت داخلی صفافی تزریق شد و ۲۰ دقیقه پس از آن تست های سنجش درد انجام شد. یافته ها: تزریق داخل صفافی اسید آسکوربیک در مقادیر ۵ mg/kg و ۱۰ mg/kg باعث افزایش آستانه درد شد. تزریق AA به میزان ۵ mg/kg باعث مهار اثر دردزای L-arginine و تقویت اثرات ضد دردی L-NAME شد و میزان درد در این گروه ها تفاوت معنی داری را نسبت به گروه دریافت کننده سرم فیزیولوژیک نشان داد. نتیجه گیری: تزریق اسید آسکوربیک باعث کاهش درد ایجاد شده پس از آسیب عصبی می شود. این اثر وابسته به مقدار بوده و حداقل قسمتی از آن مربوط به مهار مسیر NO می باشد.

کلید واژه ها: اسید آسکوربیک، نیتریک اکسید، درد نوروپاتیک

*Corresponding Author: Farinaz Nasirinezhad, Associate professor, Physiological research center, physiology department, Iran University of Medical Sciences Tel: +98- 21 88058709 fax: +98-21 88058709. email: fnasiri@iums.ac.ir

*نویسنده مسئول: فریناز نصیری نژاد، دانشیار، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایران. تلفن: ۸۸۰۵۸۷۰۹ ۰۲۱ فاکس: ۸۸۰۵۸۷۰۹-۰۲۱

۱- مقدمه

درد نوروپاتی با علائم عصبی از قبیل هیپرالژزیای اولیه و ثانویه، افزایش حساسیت محیطی و مرکزی و پدیده wind up همراه است و در ایجاد آن ترانسسمیترها نقش اساسی دارند (۱). این درد به دنبال طیف وسیعی از بیماری‌ها از جمله دیابت، ایسکمی، عفونت کموتراپی و... بروز می‌یابد. تظاهرات کلینیکی آن بسیار متفاوت بوده غالباً به صورت درد سوزشی مداوم و یا درد خود به خود از سوی بیماران گزارش می‌شود. درمان‌های فارماکولوژیک رایج برای این درد مثل ضد افسردگی‌های سه حلقه‌ای و ضد تشنج‌ها تاکنون کمتر از ۵۰٪ کارایی داشته و همراه با عوارض جانبی بوده‌اند. از سویی دیگر اپیوئیدها و داروهای ضد التهاب که درمانی مؤثر در دردهای التهابی به حساب می‌آیند متأسفانه جهت درمان درد نوروپاتی مؤثر نبوده‌اند (۲).

مشخص شده نیتریک اکسید (NO), L-arginine و آزاد کننده‌های NO مثل سدیم نیتروپروساید می‌تواند هیپرالژزیای و آلودینیا را در موش‌های نوروپاتی شدت دهند. NO چه به صورت آندوژن و چه به صورت اگزوژن در ضایعه فشار مزمن بر عصب باعث ایجاد رفتارهای ناشی از درد در رتها می‌شود. در همین راستا دیده شده که مهار کننده‌های آنزیم سازنده NO (NOS) می‌توانند درد را تخفیف دهند (۳). هم چنین در مطالعه بر روی داروی ضد صرع Zonisamide مشخص شده که اثرات ضد هیپرالژزیای و ضد آلودینیا مرکزی این دارو در ضایعه صدمه به اعصاب محیطی از طریق مهار سنتز NO اعمال می‌شود (۴).

سایر مهار کننده‌های سنتز NO مثل L-NAME نیز به هنگام کاربرد سیستمیک، یا تزریق به فضای زیر عنکبوتیه (i.t) و یا به داخل بطن‌های مغزی (i.c.v) اثرات ضد دردی داشته‌اند (۵). فعال شدن آنزیم سنتز کننده نیتریک اکسید عامل اصلی در ایجاد NO و تولید درد می‌باشد. این عمل در نتیجه فعالیت نورون‌های گلوتامینرژیک و افزایش میزان Ca^{+2} درون سلولی روی می‌دهد. در حضور کوفاکتورها و مقادیر لازم از اکسیژن و آنزیم NOS، از L-arginine، NO ساخته می‌شود که به ترمینال‌های عصبی انتشار می‌یابد و گوانیل سیکلاز را فعال می‌کند که سبب ساخته شدن گوانوزین مونوفسفات حلقوی (cGMP) از GTP می‌شود. NO هم چنین سیکلوآکسیژناز و لیپوآکسیژناز را نیز فعال می‌کند که در نتیجه آن آزادسازی پروستاگلاندین‌ها،

لکوترین‌ها و ماده P افزایش می‌یابد که این مواد موجب حساسیت رسپتورها و تولید درد می‌شوند (۶). هم چنین در CNS افزایش ساخت NO و رها شدن آن در ترمینال‌های پیش سیناپسی داخل نخاعی انتقال سیناپسی بین نورون‌های آوران و نورون‌های شاخ خلفی نخاع را تسهیل کرده که این امر باعث افزایش حساسیت این نورن‌ها به درد می‌شود (۷،۸).

اسید آسکوربیک (AA) یا ویتامین C در کنار نقش آنتی‌اکسیدانی که دارد در مطالعات بسیاری به عنوان یک تنظیم کننده عصبی مهم معرفی شده است. این ماده غلظت بالایی در CNS دارد (۱۰، ۹) و آزادسازی آن از سلول‌های مغزی به طور عمده همراه با فعالیت نورون‌های گلوتامینرژیک خصوصاً از طریق heteroexchange آسکوربات- گلوتامات از غشای نورون یا گلیاها می‌باشد (۱۲، ۱۱). بر اساس گزارشات موجود اسید آسکوربیک از مدولای آدرنال نیز همراه با کاته کول آمین‌ها ترشح می‌شود (۱۳). دی هیدروآسکوربیک اسید که فرم اکسیده شده ویتامین C است از راه گیرنده‌های glut-1 همراه با گلوکز از سد خونی- مغزی (BBB) انتقال می‌یابد (۱۴).

شواهدی وجود دارد که بیان می‌کند AA همانند یک نورو ترانسسمیتر مهاری از طریق مهار NOS باعث کاهش آزادسازی و ساخت NO می‌شود (۱۵، ۱۲). پراکسی نیتريت ایجاد درد و افزایش حرارت در بافت می‌کند اسید آسکوربیک با ترکیب مستقیم با این ماده و یا با از بین بردن موادی که برای تولید سوپراکسیدها لازمند از طریق غیر مستقیم قادر به کاهش پراکسی نیتريت می‌باشد (۱۶).

با توجه به دخالت مسیر NO در تنظیم عصبی درد و اثر ویتامین C بر آنزیم NOS این مطالعه جهت بررسی نقش مسیر NO در اثرات آنالژزیک اسید آسکوربیک بر روی درد نوروپاتی با استفاده از مدل chronic constriction injury یا CCI که یکی از کامل ترین مدل‌های درد نوروپاتی از لحاظ مطابقت با علائم نمونه انسانی می‌باشد انجام شده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱: حیوانات آزمایشگاهی

در این تحقیق که از نوع تجربی می‌باشد از موش‌های صحرایی نر نژاد wistar در محدوده وزنی

درد نوروپاتی با علائم عصبی از قبیل هیپرالژزیای اولیه و ثانویه، افزایش حساسیت محیطی و مرکزی و پدیده wind up همراه است و در ایجاد آن ترانسسمیترها نقش اساسی دارند (۱). این درد به دنبال طیف وسیعی از بیماری‌ها از جمله دیابت، ایسکمی، عفونت کموتراپی و... بروز می‌یابد. تظاهرات کلینیکی آن بسیار متفاوت بوده غالباً به صورت درد سوزشی مداوم و یا درد خود به خود از سوی بیماران گزارش می‌شود. درمان‌های فارماکولوژیک رایج برای این درد مثل ضد افسردگی‌های سه حلقه‌ای و ضد تشنج‌ها تاکنون کمتر از ۵۰٪ کارایی داشته و همراه با عوارض جانبی بوده‌اند. از سویی دیگر اپیوئیدها و داروهای ضد التهاب که درمانی مؤثر در دردهای التهابی به حساب می‌آیند متأسفانه جهت درمان درد نوروپاتی مؤثر نبوده‌اند (۲).

مشخص شده نیتریک اکسید (NO), L-arginine و آزاد کننده‌های NO مثل سدیم نیتروپروساید می‌تواند هیپرالژزیای و آلودینیا را در موش‌های نوروپاتی شدت دهند. NO چه به صورت آندوژن و چه به صورت اگزوژن در ضایعه فشار مزمن بر عصب باعث ایجاد رفتارهای ناشی از درد در رتها می‌شود. در همین راستا دیده شده که مهار کننده‌های آنزیم سازنده NO (NOS) می‌توانند درد را تخفیف دهند (۳). هم چنین در مطالعه بر روی داروی ضد صرع Zonisamide مشخص شده که اثرات ضد هیپرالژزیای و ضد آلودینیا مرکزی این دارو در ضایعه صدمه به اعصاب محیطی از طریق مهار سنتز NO اعمال می‌شود (۴).

سایر مهار کننده‌های سنتز NO مثل L-NAME نیز به هنگام کاربرد سیستمیک، یا تزریق به فضای زیر عنکبوتیه (i.t) و یا به داخل بطن‌های مغزی (i.c.v) اثرات ضد دردی داشته‌اند (۵). فعال شدن آنزیم سنتز کننده نیتریک اکسید عامل اصلی در ایجاد NO و تولید درد می‌باشد. این عمل در نتیجه فعالیت نورون‌های گلوتامینرژیک و افزایش میزان Ca^{+2} درون سلولی روی می‌دهد. در حضور کوفاکتورها و مقادیر لازم از اکسیژن و آنزیم NOS، از L-arginine، NO ساخته می‌شود که به ترمینال‌های عصبی انتشار می‌یابد و گوانیل سیکلاز را فعال می‌کند که سبب ساخته شدن گوانوزین مونوفسفات حلقوی (cGMP) از GTP می‌شود. NO هم چنین سیکلوآکسیژناز و لیپوآکسیژناز را نیز فعال می‌کند که در نتیجه آن آزادسازی پروستاگلاندین‌ها،

تزریق گردید. حیوانات گروه کنترل به جای AA، ۰/۵ ml،
نرمال سالیین به صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

۴-۲: نحوه ایجاد درد نوروپاتیک

برای این منظور از مدل CCI که توسط Bennet و xie (۱۹۸۸) پیشنهاد شده است، (۱۷) استفاده شد. جهت این منظور پس از اطمینان از بیهوشی حیوانات، موهای ناحیه ران چپ تراشیده و به موازات خار ایلیاک شکافی بر روی عضله biceps ران ایجاد شد پس از کنار زدن عضلات و نمایان شدن عصب، با استفاده از یک میله شیشه‌ای عصب از بافت‌های مجاور جدا شده و با نخ بخیه کرومیک چهار صفر چهار گره شل قبل از محل سه شاخه شدن عصب با فواصل ۱ میلی متر از یکدیگر بر روی عصب زده شد. گره‌ها به صورتی بود که در عمل خون رسانی به عصب اختلال ایجاد نشود.

پس از آن با استفاده از نخ سیلک سه صفر عضلات و پوست به صورت جداگانه بخیه زده شده و در پایان برای جلوگیری از عفونت و رشد باکتری‌ها محل جراحی با استفاده از بتادین ضد عفونی و با پماد تتراسایکلین پوشانده شد.

۵-۲: نحوه اندازه گیری هیپرالژیای مکانیکی (Randal Selitto Test)

جهت اندازه گیری هیپرالژیای مکانیکی از دستگاه analgesy-meter (شرکت Ugo Basile، ایتالیا) استفاده شد. برای انجام این تست حیوان در حالتی که شکمش از سطح زمین بالاتر باشد و احساس ناراحتی نکند با استفاده از یک حوله گرفته شده، کف پای آن بر روی محل مخصوص دستگاه قرار داده می‌شد با فشردن پدال با کمک اهرم فشاری افزایش یافته به پای حیوان وارد می‌شد و به محض عقب کشیدن پا و یا جیغ زدن حیوان اعمال نیرو متوقف شده و عدد نشان داده شده بر روی خط کش دستگاه ثبت می‌شد این تست با فواصل حداقل ۲ دقیقه برای پای چپ ۲ بار انجام می‌شد و از اعداد بدست آمده میانگین گرفته شد.

۶-۲: نحوه اندازه گیری هیپرالژیای حرارتی (Radiant heat test)

برای انجام این قسمت از دستگاه plantar test (شرکت Ugo Basile، ایتالیا) استفاده شد به این ترتیب که حیوان در محفظه مخصوص دستگاه قرار داده شده و پس از ۱۰ دقیقه سازگاری با محیط اشعه حرارتی به کف پای آن تابانده می‌شود. از زمان شروع تابش کرونومتر شروع به فعالیت می‌کند و به محض حرکت دادن و یا بلند کردن پا کرونومتر متوقف شده و

۳۰۰-۲۵۰ گرم استفاده شده است. حیوانات از مرکز پرورش حیوانات انستیتو پاستور تهیه شدند و قبل از شروع آزمایش جهت سازگاری با شرایط آزمایشگاهی حداقل به مدت سه هفته در قفس‌های مخصوص در حیوانخانه با درجه حرارت با شرایط نوری طبیعی نگهداری شده و با غذای مخصوص تغذیه می‌شدند. در زمان آزمایش حیوانات به صورت تصادفی به ۸ گروه زیر تقسیم شده و هر گروه شامل ۸ موش صحرایی بود.

۱) گروه دریافت کننده AA به میزان ۱ mg/kg

۲) گروه دریافت کننده AA به میزان ۵ mg/kg

۳) گروه دریافت کننده AA به میزان ۱۰ mg/kg

۴) گروه دریافت کننده نرمال سالیین

۵) گروه دریافت کننده اسید آسکوربیک (۵ mg/kg)

و L-arginine (۵۰۰ mg/kg)

۶) گروه دریافت کننده اسید آسکوربیک (۵ mg/kg) و

L-NAME (۲۰ mg/kg)

۷) گروه دریافت کننده نرمال سالیین و L-arginine

(۵۰۰ mg/kg)

۸) گروه دریافت کننده نرمال سالیین و L-NAME

(۲۰ mg/kg)

۲-۲: داروهای مورد استفاده

به منظور بیهوشی حیوانات از پودر پنتاباریتال سدیم به میزان ۶۰ mg/kg استفاده شد. همچنین پودر اسید آسکوربیک به میزان ۱ mg/kg، ۵ mg/kg، ۱۰ mg/kg L-arginine به مقدار ۵۰۰ mg/kg و L-NAME به میزان ۲۰ mg/kg در گروه‌های مختلف به کار گرفته شد. تمامی مواد مورد استفاده در این تحقیق از شرکت Sigma تهیه و جهت تزریق در سرم فیزیولوژیک حل شده و به روش داخل صفاقی (i.p) تزریق شدند.

۳-۲: نحوه به کار گیری داروها

برای تعیین مقدار موثر اسید اسکوربیک جهت تقلیل درد، در زمان حداکثر درد، ۲ هفته پس از انجام CCI، مقادیر متفاوت اسید آسکوربیک در نرمال سالیین حل شده و بلافاصله با حجم ۰/۵ ml تزریق گردید. حیوانات گروه کنترل ۰/۵ ml نرمال سالیین دریافت کردند.

پس از تعیین مقدار موثر از اسید آسکوربیک به منظور بررسی دخالت مسیر نیتریک اکسید در اثرات ضد دردی ویتامین C در گروه‌های جداگانه‌ای دو هفته پس از انجام CCI، اسید آسکوربیک به مقدار ۵ mg/kg تزریق گردید و ۳۰ دقیقه پس از آن L-arginine به مقدار ۵۰۰ mg/kg یا L-NAME به میزان ۲۰ mg/kg

آستانه حس حرارتی را بالا برده به طوری که withdrawal latency به دنبال تابش اشعه به کف پا در حیوانات این گروه‌ها تفاوت معنی داری را ($P < 0.001$) نسبت به گروه دریافت کننده نرمال سالین نشان می‌دهد.

withdrawal latency در حیواناتی که نرمال سالین دریافت کرده بودند ۱۵ و ۳۰ دقیقه بعد از تزریق به ترتیب $5/1 \pm 0/5$ و $5/0.9 \pm 0/46$ است در حالی که در حیواناتی که ۵ mg/kg اسید آسکوربیک دریافت نموده بودند. این زمان افزایش یافته و ۱۵ و ۳۰ دقیقه بعد از تزریق به ترتیب $9/5 \pm 0/36$ و $9/2 \pm 0/39$ ثانیه شده است.

تزریق ۱۰ mg/kg از اسید آسکوربیک نیز اثر مشابهی در withdrawal latency داشته و در حیوانات این گروه نیز ۱۵ و ۳۰ دقیقه بعد از تزریق این زمان به ترتیب $9/0.8 \pm 0/24$ و $8/7 \pm 0/31$ ثانیه بوده است. تزریق اسید آسکوربیک به میزان ۱ mg/kg اثری بر هیپرالژزیای حرارتی ایجاد شده به دنبال CCI نداشته و ۱۵ و ۳۰ دقیقه بعد از تزریق withdrawal latency در حیوانات این گروه به ترتیب $5/9 \pm 0/2$ و $5/6 \pm 0/2$ ثانیه بوده و تفاوت معنی داری بین گروهی که به میزان ۱ mg/kg اسید آسکوربیک دریافت نموده‌اند با گروه دریافت کننده نرمال سالین دیده نشد که نشان دهنده بی تأثیر بودن این مقدار از ویتامین C در تغییر آستانه حس حرارتی در حیوانات CCI شده می‌باشد.

withdrawal latency در حیواناتی که نرمال سالین و یا اسید آسکوربیک دریافت کرده بودند در دقیقه ۱۵ و ۳۰ بعد از تزریق تفاوت معنی داری را نشان نداد.

مشابه نتایج ذکر شده در تست‌های مربوط به سنجش هیپرالژزیای و آلودینیای مکانیکی نیز وجود دارد. (نمودارهای ۱B و ۱C). تزریق ۱۰ mg/kg و ۵ اسید آسکوربیک باعث افزایش آستانه حس مکانیکی شده و در حیوانات این گروه ۱۵ و ۳۰ دقیقه بعد از تزریق تفاوت معنی داری ($P < 0/001$) در آستانه حس مکانیکی نسبت به حیوانات دریافت کننده نرمال سالین دیده شد. نتایج آماری به دست آمده تفاوت معنی دار در آستانه حس مکانیکی بین حیواناتی که اسید آسکوربیک به میزان ۱ mg/kg دریافت کرده بودند با حیواناتی که نرمال سالین دریافت نموده بودند را نشان نداد. ۱۵ و ۳۰ دقیقه بعد از تزریق ۵ mg/kg از آسکوربات آستانه حس مکانیکی در تست randal selitto $10/27 \pm 0/62$ ، $10/78 \pm 0/39$ و

Time latency ثبت می‌شد. این عمل برای پای آسیب دیده ۳ بار به فواصل حداقل ۲ دقیقه انجام گردید و سپس میانگین اعداد بدست آمده ثبت گردید.

۷-۲: نحوه اندازه گیری آلودینیای مکانیکی

به این منظور از موشهای Von-frey با شماره‌های ۵/۸۸، ۵/۷۴، ۴/۹۳، ۴/۰۷، ۵/۰۷، ۵/۱۸، ۵/۴۶ و ۵/۸۸ استفاده شد برای انجام آن حیوان در محفظه‌ای با کف مشبک که ۳۰ سانتی متر بالاتر از سطح زمین قرار داشت گذاشته شده و هر مو به طور عمود با فشاری که باعث خم شدن آن شود با فواصل ۱۰ ثانیه، ۵ بار برای پای آسیب دیده مورد آزمایش قرار گرفت و سه بار بلند کردن و یا حرکت دادن پا برای آن شماره از تار مو مثبت تلقی شد.

۸-۲: ترتیب انجام جراحی و تست‌های رفتاری

در کلیه گروه‌ها، ابتدا جراحی CCI برای هر حیوان انجام شد و ۲ هفته پس از آن یعنی در زمان حداکثر درد استعمال دارو و تست‌های رفتاری انجام گرفت. در گروه‌هایی که مقادیر متفاوت اسید آسکوربیک را به شیوه گفته شده دریافت می‌کردند ۱۵ و ۳۰ دقیقه پس از تزریق تست‌های رفتاری مذکور انجام شد و در گروه‌های کنترل آن نیز پس از تزریق نرمال سالین با همین شیوه، تست‌های رفتاری انجام گردید. در گروه‌هایی که AA به علاوه دارو دریافت می‌کردند، ۳۰ دقیقه پس از تزریق ویتامین C داروی L-arginine و یا L-NAME تزریق شده و ۲۰ دقیقه بعد از آن رفتار حیوان مورد بررسی قرار گرفت. گروه کنترل نیز با دریافت نرمال سالین به جای اسید آسکوربیک با همین پروتکل تست رفتاری شدند.

۹-۲: بررسی آماری

جهت بررسی وجود تفاوت معنی دار بین گروه‌های دریافت کننده دارو و نرمال سالین از برنامه نرم افزاری Graphpad و تست آماری two way ANOVA و Newman-keuls استفاده گردید، نتایج به صورت $Mean \pm SEM$ نشان داده شده است و $P < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

۳- نتایج

نمودار ۱A نشان دهنده اثر تزریق مقادیر مختلف ویتامین C و نرمال سالین بر هیپرالژزیای حرارتی ایجاد شده دو هفته پس از انجام عمل CCI می‌باشد. همان گونه که در نمودار مشخص است تزریق داخل صفاقی ۱۰ mg/kg و ۵ اسید آسکوربیک،

پای حیوان وجود دارد. ($P < 0/001$) withdrawal latency در حیواناتی که به همراه L-arginine، اسید آسکوربیک دریافت کرده بودند $6/76 \pm 0/56$ و در حیواناتی که نرمال سالین گرفته بودند $4/42 \pm 0/23$ بود.

هم چنین بر اساس نتایج بدست آمده تزریق L-NAME به همراه اسید آسکوربیک باعث کاهش علائم هیپرآلژزیای حرارتی نسبت به گروهی شده که L-NAME به همراه نرمال سالین دریافت کرده‌اند به طوری که withdrawal latency در گروه دریافت کننده L-NAME و آسکوربات $8/33 \pm 0/37$ و در گروه کنترل که L-NAME و نرمال سالین گرفته‌اند $5/8 \pm 0/2$ بوده است. ($P < 0/001$) نمودار B ۲ و C ۲ به ترتیب نشان دهنده مقایسه تزریق L-arginine و L-NAME بعد از تزریق آسکوربات و یا نرمال سالین در هیپرآلژزیا و آلودینیای مکانیکی می‌باشد. در تست اندازه گیری هیپرآلژزیای مکانیکی نیز مشابه نتایج به دست آمده از تست هیپرآلژزیای حرارتی، آستانه حس مکانیکی در حیواناتی که L-arginine به دنبال تزریق ویتامین C دریافت نموده‌اند به طور معنی‌دار ($P < 0/001$) بیشتر از حیواناتی است که به جای اسید آسکوربیک نرمال سالین گرفته بودند و در گروهی که پس از تزریق آسکوربیک اسید، L-NAME گرفته‌اند، علائم هیپرآلژزیای مکانیکی نسبت به گروه کنترل که به جای ویتامین C، نرمال سالین دریافت داشته‌اند، بهبود چشم گیری یافته است.

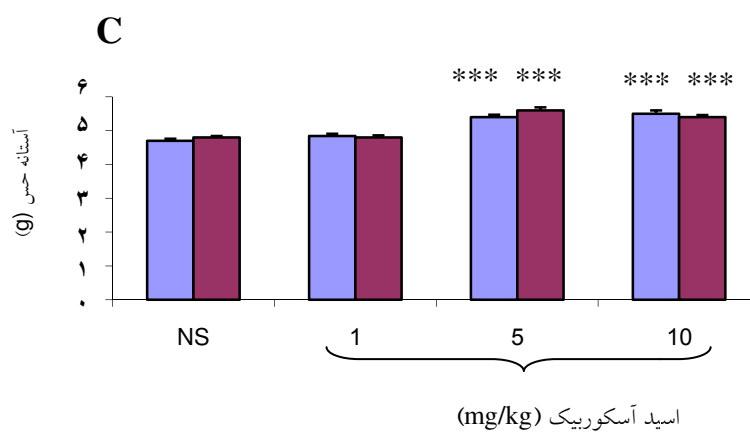
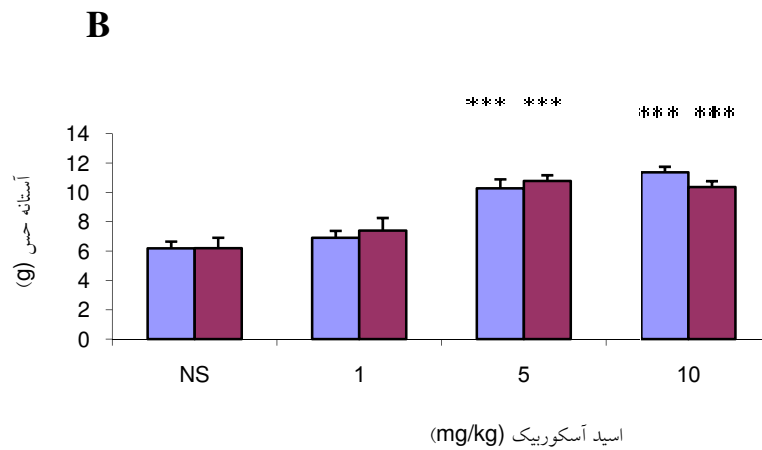
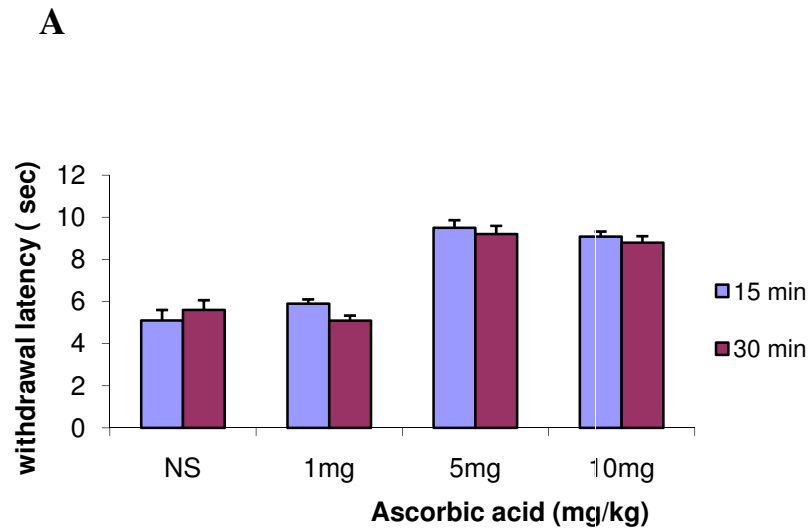
به طوری که آستانه حس مکانیکی در تست Randal Selitto در حیواناتی که L-arginine و ویتامین C گرفته‌اند $8/8 \pm 0/71$ و در گروه کنترل آن $5/2 \pm 0/47$ بوده است و نتایج این تست در گروه دریافت کننده L-NAME و آسکوربات و گروه کنترل آن به ترتیب $9/98 \pm 0/82$ و $5/8 \pm 0/27$ می‌باشد. همان طور که در نمودار C ۲ مشاهده می‌شود در تست von frey آستانه حس مکانیکی در گروه دریافت کننده L-arginine و یا L-NAME به همراه آسکوربات با گروهی که به جای آسکوربات نرمال سالین دریافت کرده‌اند تفاوت معنی داری وجود ندارد.

در تست Von Frey به ترتیب $5/6 \pm 0/09$ ، $5/4 \pm 0/07$ می‌باشد که تفاوت مشخصی نسبت به زمانی که مقدار تزریقی اسید آسکوربیک به دو برابر افزایش یافته (10 mg/kg) نشان نمی‌دهد. (به ترتیب $11/36 \pm 0/39$ ، $10/36 \pm 0/41$ در تست randal selitto و $5/5 \pm 0/1$ ، $5/4 \pm 0/06$ در تست von frey) در حیواناتی که 1 mg/kg اسید آسکوربیک گرفته بودند آستانه حس مکانیکی ۱۵ دقیقه بعد از تزریق در تست randal selitto و $6/9 \pm 0/48$ و در von frey $4/84 \pm 0/07$ بود این مقادیر ۳۰ دقیقه بعد از تزریق به ترتیب به $7/39 \pm 0/87$ و $4/8 \pm 0/06$ تغییر کرد.

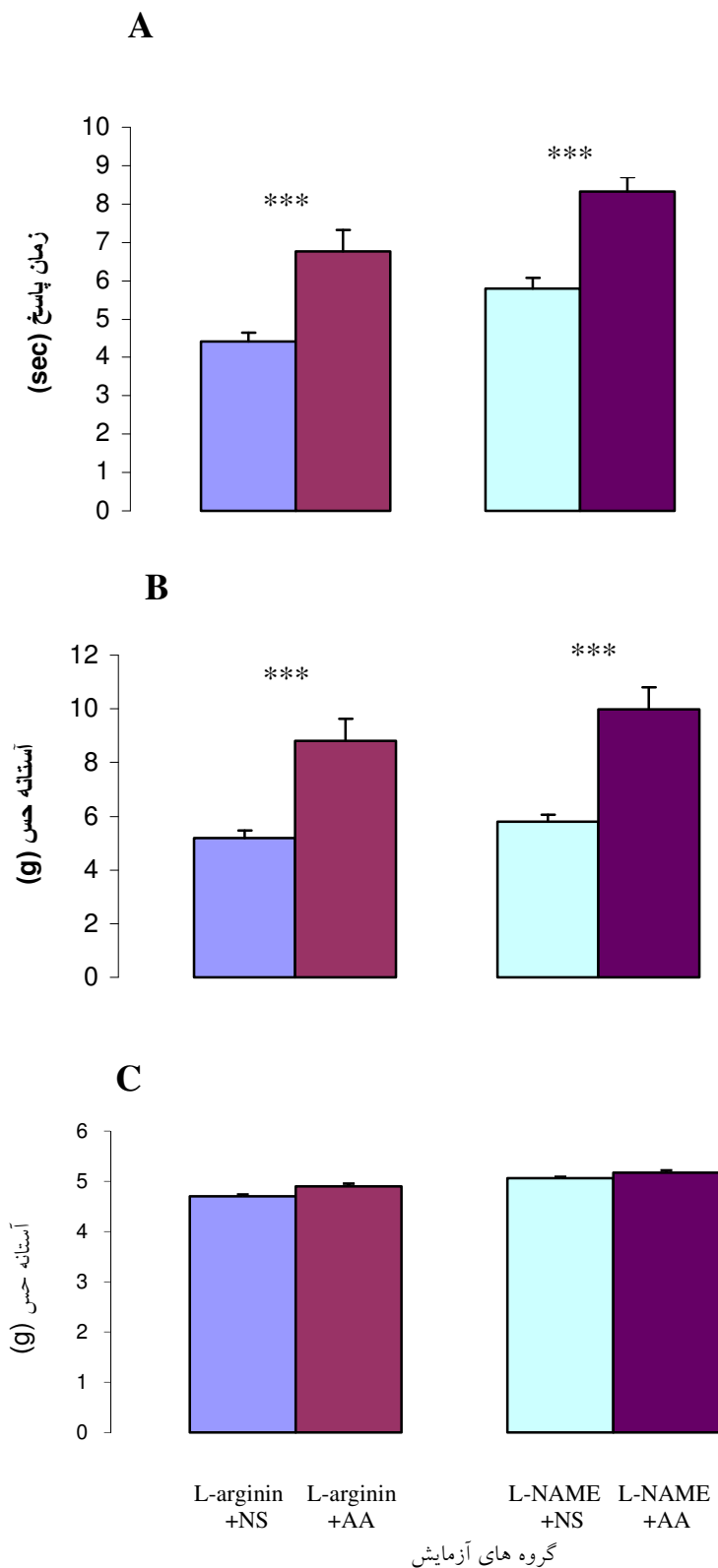
در حیواناتی که به جای اسید آسکوربیک نرمال سالین دریافت نموده بودند ۱۵ و ۳۰ دقیقه بعد از تزریق آستانه حس مکانیکی در تست randal selitto به ترتیب $6/18 \pm 0/47$ و $6/2 \pm 0/71$ در تست von frey به ترتیب $4/7 \pm 0/06$ و $4/8 \pm 0/04$ بود که بر اساس تست‌های آماری نتایج معنی داری بین این گروه با گروهی که آسکوربات به میزان 1 mg/kg دریافت کرده بودند وجود نداشت.

در بررسی نقش مسیر NO در ایجاد اثرات ضد دردی اسید آسکوربیک با توجه به این که تزریق 5 mg/kg از آسکوربات باعث افزایش آستانه حس درد می‌شود این مقدار از ویتامین C به همراه داروهای L-arginine (تولید کننده NO) و L-NAME (مهار کننده NO) به کار گرفته شد.

نمودار A ۲ نشان دهنده مقایسه تزریق L-arginine (500 mg/kg) و L-NAME (20 mg/kg) بعد از تزریق AA و یا نرمال سالین در هیپرآلژزیای حرارتی ایجاد شده دو هفته بعد از آسیب عصبی می‌باشد. با توجه به نمودار تزریق 5 mg/kg از آسکوربات مانع از اثر دردزای قابل انتظار از مقدار گفته شده L-arginine می‌شود. در صورتی که تزریق همین مقدار از L-arginine به همراه نرمال سالین باعث بروز علائم هیپرآلژزیای حرارتی می‌شود و تفاوت معنی داری بین گروهی که به همراه L-arginine، اسید آسکوربیک دریافت کرده‌اند با گروه دریافت کننده نرمال سالین در withdrawal latency حاصل از تابش اشعه به کف



نمودار ۱: نتایج مربوط به دقیقه ۱۵ و ۳۰ تست اندازه‌گیری هیپرالژزیای حرارتی (A) و مکانیکی (B) و آلودینیای مکانیکی (C) در گروه‌هایی که مقادیر مختلف از AA به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. *** تفاوت معنی دار ($P < 0.001$) نسبت به گروه دریافت کننده نرمال سالین می باشد.



نمودار ۲. نتایج مربوط به تست اندازه گیری هیپرآلژزیای حرارتی (A) و مکانیکی (B) و آلودینیای مکانیکی (C) در گروههایی که ۳۰ دقیقه پس از دریافت AA (۵ mg/kg) یا نرمال سالین (NS) ، L-arginine (۵۰۰ mg/kg) و یا L-NAME (۲۰ mg/kg) دریافت کردند. *** نشان دهنده تفاوت معنی دار ($P < 0.001$) نسبت به گروه دریافت کننده نرمال سالین می باشد.

جدول ۱. تغییرات آستانه حس مکانیکی و حرارتی ۱۵ و ۳۰ دقیقه بعد از تزریق در گروه های دریافت کننده نرمال سالین و اسید آسکوربیک

دقیقه	اسید آسکوربیک (۱۰ Mg/kg)	اسید آسکوربیک (۵ Mg/kg)	اسید آسکوربیک (۱ Mg/kg)	نرمال سالین
هیپرآلژزیای حرارتی	۹/۰۸ ± ۰/۲۴	۹/۰۵ ± ۰/۳۶	۵/۹ ± ۰/۲	۵/۱ ± ۰/۵
هیپرآلژزیای مکانیکی	۱۱/۳۶ ± ۰/۳۹	۱۰/۲۷ ± ۰/۶۲	۶/۹ ± ۰/۴۸	۶/۱۸ ± ۰/۴۷
آلودینیای مکانیکی	۵/۵ ± ۰/۱	۵/۴ ± ۰/۰۷	۴/۸ ± ۰/۰۷	۴/۷ ± ۰/۰۶
	۵/۴ ± ۰/۰۶	۵/۶ ± ۰/۰۹	۴/۸ ± ۰/۰۶	۴/۸ ± ۰/۰۴

جدول ۲. تغییرات آستانه حس مکانیکی و حرارتی در گروه هایی که به همراه نرمال سالین و اسید آسکوربیک داروهای L-NAME, L-arginine نیز دریافت کرده اند.

L-arginine+AA	L-NAME+AA	L-arginine+NS	L-NAME+NS	
۶/۷۶ ± ۰/۵۶	۸/۳۳ ± ۰/۳۷	۴/۴۲ ± ۰/۲۳	۵/۸ ± ۰/۲	هیپرآلژزیای حرارتی
۸/۸ ± ۰/۷۱	۹/۹۸ ± ۰/۸۲	۵/۲ ± ۰/۴۷	۵/۸ ± ۰/۲۷	هیپرآلژزیای مکانیکی
۴/۹ ± ۰/۰۵	۵/۱۷ ± ۰/۰۵	۴/۷ ± ۰/۰۴	۵/۰۶ ± ۰/۰۳	آلودینیای مکانیکی

پلکسوس ها و یا اعصاب مرکزی به وجود می آید. مکانیسم های ایجاد کننده آن چندگانه و پیچیده اند و از مهم ترین علایم آن پاسخ های غیر طبیعی به محرک مثل آلودینیا، هیپرآلژزیای و هیپرپتیا (hyperpathia) هستند که با تست های رفتاری قابل ارزشیابی اند. (۱۸) به همین دلیل داروهای آنالژژیک موثر بر این درد بیشتر بر اساس اثر بر دو مشخصه هیپرآلژزیای و آلودینیا ارزیابی فارماکولوژیکی می شوند. (۱۹)

نتایج این بررسی نشان داد که تزریق داخل صفاقی اسید آسکوربیک توانایی تخفیف علایم درد ناشی از آسیب عصبی را دارد و این اثر وابسته به مقدار مصرفی آن است.

بر اساس نتایج بررسی های رفتاری مقادیر ۵ و ۱۰ mg/kg از آسکوربات به طور معنی دار درد را در

جدول ۱ و ۲ به طور خلاصه تغییرات آستانه حس مکانیکی و حرارتی را در گروه های مختلف نشان می دهد.

با توجه به این که تزریق ۵ mg/kg از اسید آسکوربیک قادر به تغییر رفتار درد به دنبال عمل CCI بوده است به نظر می رسد تزریق این مقدار از AA می تواند مانع عمل درد زای ماده L-arginine به عنوان تولید کننده NO شود و از سوی دیگر فعالیت ضد دردی ماده L-NAME را که یک مهار کننده تولید NO است، تشدید نماید.

۴- بحث

درد نوروپاتی که به دنبال آسیب اولیه یا ایجاد اختلال در عملکرد سیستم عصبی اعم از اعصاب محیطی،

و همکارانش نیز نشان دهنده اثرات ضد دردی آنتی اکسیدان‌ها از جمله ویتامین C در غلظت‌های بالا می‌باشد. آزمایش‌های او نیز که بر روی انسان انجام گرفت نشان داد که استفاده از این ویتامین می‌تواند درد مزمن ناحیه شکم را که در اثر التهاب پانکراس ایجاد می‌شود را تسکین داده و کیفیت زندگی را در این افراد بالا ببرد (۲۳).

آن چه مسلم است آسکوربات یک آنتی اکسیدان قوی است که سطح خارج سلولی آن در CNS در پاسخ به محرک‌های متفاوت از جمله استفاده از اسیدهای آمینه تحریکی و GABA تغییر می‌کند و ترشح آن به میزان زیادی با فعالیت سیستم گلوتامینرژیک تنظیم می‌شود (۲۴). به طوری که در وزیکول‌های سیناپسی نورون‌های گلوتامینرژیک از طریق انتقال فعال تغلیظ شده و در پی تحریک این نورون‌ها آزاد می‌شود (۲۵، ۸). از طرف دیگر اکسید نیتریک (NO) در نورون‌های گلوتامینرژیک با یک مکانیسم وابسته به Ca^{+2} باعث آگزوستیوز AA از وزیکول‌های سیناپسی حاوی آن می‌شود و در عدم حضور Ca^{+2} یا با وجود برخی مهار کننده‌های NOS مثل NMMA آزادسازی ویتامین C مهار می‌شود.

این مهار کننده آنزیم NOS با بلوک دیپلاریزاسیون غشای نورن‌های حاوی وزیکول AA مانع از آزادسازی آن می‌شود (۲۵، ۸، ۳). با توجه به این داده‌ها می‌توان گفت آسکوربات یک Co-transmitter است که همراه با سایر ترانسمیترها از وزیکول‌های سیناپسی آزاد شده و در کاهش فعالیت شیمیایی NO هم نقش دارد (۸). بر این اساس برای تعیین نقش NO در اثرات آنالژزیک ویتامین C در این بررسی از دو ماده متفاوت L-arginine و L-NAME استفاده شده است.

L-arginine باعث تولید NO شده در حالی که L-NAME با مهار آنزیم NOS مانع از ساخته شدن NO می‌شود. بر طبق دانسته‌های پیشین مقدار ۵۰۰ mg/kg از L-arginine علائم هیپراآلژزیا و آلودینیا را در موش‌های CCI شده تشدید می‌نماید و این اثر ۱ ساعت پس از تزریق به حداکثر خود می‌رسد (۳).

در مطالعه حاضر نیز در گروه کنترل که به همراه L-arginine نرمال سالین دریافت کردند علائم هیپراآلژزیا و آلودینیا مکانیکی و هیپراآلژزیا حرارتی شدت یافته در حالی که تزریق آن به دنبال تزریق

تست‌های مورد استفاده کاهش می‌دهد. اثر ضد دردی AA در کاهش هیپراآلژزیا حرارتی و مکانیکی و آلودینیا مکانیکی تقریباً یکسان اعمال می‌شود. به علاوه تفاوت معنی دار میان پاسخ‌های دقیقه ۱۵ و ۳۰ دیده نشد، بنابراین اثر ضد دردی ویتامین C حداقل تا ۳۰ دقیقه پس از کاربرد داخل صفاقی آن باقی می‌ماند در حالی که ۱ mg/kg از آسکوربات هیپراآلژزیا و آلودینیا را تخفیف نمی‌دهد.

پیش از این گزارش شده است که در تست فرمالین مقادیر ۳ و ۵ mg/kg از ویتامین C در موش‌های سویسی علائم درد را در هر دو فاز ابتدایی و تأخیری این تست کاهش می‌دهد (۲۰).

از آن جا که انجام تست فرمالین حدوداً ۱ ساعت زمان می‌برد AA در این مدت اثر ضد دردی خود را حفظ می‌کند. بعلاوه در بررسی انجام شده توسط Rosa و همکارانش نیز تزریق ۱ mg/kg آسکوربات اثری بر کاهش درد حاصل از تزریق فرمالین ایجاد نکرده است، که این امر با نتایج حاصل از تحقیق حاضر مطابقت دارد. اما بر خلاف نتایج مطالعه حاضر که تفاوتی در اثر ضد دردی مقادیر ۱۰ و ۵ mg/kg از AA دیده نشد در مطالعه‌ای که توسط kelson A. Rosa و همکارانش انجام گرفته با افزایش غلظت آسکوربات اثر آنالژزیک آن در درد حاصل از تزریق فرمالین کاهش یافته و به طوری که تزریق ۱۰ mg/kg از آن درد را کاهش نداده است (۲۰).

تفاوت بین نتایج به دست آمده در این تحقیق و مطالعه حاضر احتمالاً به دلیل نوع تست به کار گرفته شده و یا شاید نوع درد ایجاد شده می‌باشد در این رابطه نتایج حاصل از آزمایش Davis و همکارانش نیز نشان دهنده اثر ضد دردی AA در مقادیر بالا می‌باشد.

بر اساس مطالعات این محققین کاربرد زیر پوستی ۱۵۰ mg/kg از AA در مدل موش‌های مبتلا به آرتریت نیز آستانه درد را افزایش می‌دهد (۲۱). با توجه به این داده‌ها می‌توان نتیجه گرفت که AA در مقادیر بالا و غیر سمی هم توانایی تخفیف علائم درد را دارد. هم چنین نتایج مربوط به آزمایش‌های Rogers و Ricketts که بر روی انسان انجام شد نیز نشان داد که مقادیر بالای ویتامین C می‌تواند درد ناشی از شکستگی مچ دست را تسکین دهد (۲۲).

این نتایج نیز نشان دهنده اثر وابسته به مقدار این ویتامین در تسکین درد می‌باشد که مشابه نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر می‌باشد. نتایج آزمایش‌های Kirk

هیپرالژیا را نسبت به زمانی که L-NAME به همراه نرمال سالین به صورت سیستمیک داده می‌شود در پای CCI شده بیشتر کاهش می‌دهد که این اثر می‌تواند نتیجه همراهی عملکرد اسید اسکوربیک و L-NAME در مهار سنتز NO و کاهش فعالیت آن باشد که منجر به تخفیف بیشتر علائم ناشی از صدمه عصبی شده است.

۵- نتیجه گیری

بر اساس نتایج بدست آمده اسید اسکوربیک قادر است آستانه درد را بدنال آسیب عصبی بهبود بخشد و اثر ضد دردی این ویتامین وابسته به دوز بوده و حداقل تا ۳۰ دقیقه بعد از مصرف نیز باقی می‌ماند. با توجه به نقش مسیر NO در ایجاد دردهای نوروپاتیک و بر اساس دخالت آنتی اکسیدان‌ها در این مسیر، حداقل قسمتی از اثرات ضد دردی اسید اسکوربیک از طریق دخالت در مسیر اکسید نیتریک می‌باشد.

بنابراین با توجه به پیچیدگی درمان دارویی دردهای نوروپاتیک و عوارض جانبی داروهای فارماکولوژیک حاضر در درمان آن، اسید اسکوربیک هم می‌تواند در کنار داروهای تسکین دهنده دیگر و یا به تنهایی در مقادیر غیر سمی در درمان دردهای نوروپاتیک موثر باشد.

۶- تشکر و قدردانی

در پایان از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران که با حمایت مالی خود امکان انجام این پژوهش را فراهم نمودند صمیمانه تشکر می‌کنیم.

۵ mg/kg از AA موجب تخفیف علائم درد ناشی از CCI شده است. به نظر می‌رسد این میزان از AA با کاهش فعالیت شیمیایی NO مانع از ایجاد تغییرات دردزای L-arginine شده است.

هم چنین از آن جا که آسکورات یک آنتی اکسیدان قوی به شمار می‌رود این احتمال وجود دارد که به طور مستقیم و یا با از میان برداشتن سوبستراهای لازم از طریق سیستم آنزیمی گزانتین اکسیداز از ساخت سوپراکسید و اکسید نیتریک جلوگیری می‌کند و با پیشگیری از واکنش‌های پراکسیداتیو در تقلیل رفتارهای ناشی از درد نوروپاتیک موثر می‌باشد (۲۶، ۲۷).

از سوی دیگر در این تحقیق نتایج ترزیق سیستمیک ۲۰ mg/kg از L-NAME به دنبال تزریق داخل صفاقی ۵ mg/kg از AA بیانگر آن است که علائم مربوط به هیپرالژزیای حرارتی و مکانیکی در گروه مورد مطالعه نسبت به گروه کنترل بهبودی بیشتری پیدا کرده‌اند. مشخص شده است که مهار کننده‌های آنزیم NOS، درد نوروپاتیک را تخفیف می‌دهند (۱۲). L-NAME که به طور غیر اختصاصی تمامی ایزوفرم‌های آنزیم NOS را بلوک می‌کند افزایش حساسیت به درد را در موش‌های نوروپاتیک کاهش می‌دهد (۲۸). همچنین مهار کننده‌های اختصاصی NOS مثل GW ۲۷۴۱۵۰ به صورت وابسته به مقدار هیپرالژزیای ناشی از CCI را تخفیف می‌دهند (۱۴). درمان با آسکورات با افزایش آسکورات درون سلولی ساخت NOS را کاهش می‌دهد (۱۲).

با توجه به نتایج قابل مشاهده در نمودارهای مربوطه اسید اسکوربیک در کنار L-NAME به طور معنی دار

References:

1. Herrero J.F., Larid J.M., Lopez-Garcia J.A. Wind-up of spinal cord neurons and pain sensation: much ado about something? *Progress in neurobiology*, 2000, 61(2) : 169-203.
2. Bridges D, Thompson S.W., Rice A.S. Mechanism of neuropathic pain, *British Journal of Anesthesiology*, 2001, 87(1): 12-16.
3. Naik A.K., Tandan S.K., Kumar D., Dudhgankar S.P. Nitric oxid and its modulators in chronic constriction injury- induced neuropathic pain in rat, *European Journal of pharmacology*, 2006, 530(1-2): 59-69.
4. Tanabe M., Sakave A., Takasu A., Honda M., Ono H., Centrally mediated antihyperalgesic and antiallodynic effects of zonisamide following partial nerve injury in the mouse, *Naunyn Schmiedebergs Arch pharmacology*, 2005, 372(2): 107-14.
5. Mc Roberts J.A., Coutiho S.V., Marvizon J.C., Grady F.F., Tognetto M., Sengupata J.N., Enners H.S., Chaban V.V. Role of Peripheral N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in visceral nociception in rats, *Gastroenterology*, 2001, 120(7): 1737-48.
6. Tal M. A novel antioxidant alleviates heat hyperalgesia in rats with an experimental painful peripheral neuropathy, *Neuroreport*, 1996, 7(8): 1382-4.
7. Alba J., Clayton N.M., Collins S.D., Colthup P., Chessell I., Knowles R.G. GW 274150, a novel and highly selective inhibitor of the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS), shows analgesic effect in rat models of inflammatory and neuropathic pain, *Pain*, 2006, 120 (1-2) : 170-81.
8. Karanth S., Yu W.H., Walczewska A., Mastronardic M.C., Cann S.M. Ascorbic acid acts an inhibitory transmitter in the hypothalamus to inhibit stimulated luteinizing hormone-releasing hormone release by scavenging nitric oxide, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United State of America*, 2000, 97(4): 1891-6.
9. Grunewald R.A. Ascorbic acid in the brain. *Brain Research Review*, 1993, 18(1): 123-33.
10. Rosa A., Lin J., Calixto J.B., Santos A.R., Rodrigus A.L. Involvement of NMDA receptors and L-arginine nitric oxide pathway in the antidepressant-like effects of zinc in mice, *Behavioral Brain Research*, 2003, 144(1-2): 87-93.
11. Cammack J., Ghasemzadeh A., Adams R.N. The pharmacological profile of glutamate-evoked ascorbic acid efflux measured by in vivo electrochemistry, *Brain Research*, 1991, 565(1): 17-22.
12. Korcok, WU F., Tyml K., Hammond R.R., Wilson J.X. Sepsis inhibits reduction of dehydroascorbic acid and ascorbate depletion increases nitric oxide synthase induction and glutamate uptake inhibition, *Journal of Neurochemistry* 2002, 81(1): 185-93
13. Bronstein S.R., Patak P., willenberg H.S. A vitamin C is an important cofactor for both adrenal cortex and adrenal medulla. *Endocrine Research*, 2004, 30 (4) : 871-5.
14. Huang J., Agus D.B., winfree C.J., kiss S., Mack W.J. Dehydroascorbic acid, a blood brain barrier transportable form of vitamin C, mediates potent cerebroprotection in experimental stroke, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United State of America*, 2001, 98(20):11720-4
15. Lery D., Hoke A., Zochodne D.W. Local expression of inducible nitric oxide synthase in an animal model of neuropathic pain *Neuroscience Letter*, 1999, 260(3): 207-9.
16. Van Dyke K., Sacks M., Qazi N. A new Screening method to detect water- soluble antioxidants: acetaminophen (Tylenol) and other phenols react as antioxidants and destroy peroxyxynitrite based luminol-dependent chemiluminescence, *Journal of Bioluminescence and chemiluminescence*, 1998, 13(16): 339-48.
17. Bennett G.J., xie Y.K. A peripheral mononeuropathy in rat that produce disorder of pain sensation like those seen in man, *Pain*, 1988, 33:87-107.
18. Attal N. Chronic neuropathic pain: mechanism and treatment, *Clinical Journal of Pain*, 2000, 16(3 suppl): S118-30.
19. Galluzzi K.E. Management of neuropathic pain, *The Journal of the American Osteopathic Association*, 2005, 105 (9 suppl 4): S 12-9.
20. Rosa K.A., Gadotti V.M., Rosa A.O. Evidence for the involvement of glutamatergic system in the antinociceptive effect of ascorbic acid, *Neuroscience letter*, 2005, 381(1-2): 185-8.
21. Davis R.H., Rosenthal K.Y., Cesario L.R., Rouw G.R. Vitamin C influence on localized adjuvant arthritis, *Journal of the American Podiatric Medical Association*, 1990, 80(8): 414-8.
22. Zollinger P.E., Tuinebreijer W.E., Breederveld R.S., Kreis R.W. Can vitamin C prevent complex regional pain syndrome in patients with wrist fractures? A randomized controlled multicenter dose-response study. *The Journal of Bone and joint surgery American Volume*, 2007, 89(7):1424-31.
23. Kirk G.R., White J.S., Mckie L., Stevenson M., Young L., Clements W.D., et al. Combined antioxidant therapy reduces pain and improves quality of life in chronic pancreatitis, *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 2006, 10(4): 499-503.

24. Rice M.E. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain, *Trends in Neuroscience*, 2000, 23(5): 299-16.
25. Rebec G.V., Pierce R.C. A vitamin as a neuromodulator release; ascorbate release into the extracellular fluid of the brain regulates dopaminergic and glutamatergic transmission, *Progress in Neurobiology*, 1994, 43(6): 537-65.
26. Gordh T. The role of nitric oxide in neuropathic pain and neurodegeneration, *Acta Anaesthesiologica Scandinavica. Supplementum* , 1998, 113: 29-30.
27. Kacmaz M., Oztrok H.S., Karaayvaz M., Guven C., Durak I. Enzymatic antioxidant defense mechanism in rat intestinal tissue is changed after ischemia-reperfusion, Effects of an allopurinol plus antioxidant combination, *Canadian Journal of surgery*, 1999, 42(6): 427-31.
28. Hao J.X., Xu X.J. Treatment of a chronic allodynia like response in spinally injured rats: effects of systemically administered excitatory amino acid receptor antagonists, *Pain*, 1996, 66(2-3): 279-85.