

Decrease in blood flow and temperature of rat knee joint by calcium channel blockers in chronic inflammation

M. Khaksari Hadad, PhD¹ M.R. Rahmani, MSc² Gh.R. Asadi Karam, PhD³ S. Hajizadeh, PhD⁴ M. Shahrani, MSc⁵

Professor Department of Physiology¹, Kerman University of Medical Sciences, Instructor Department of Physiology², Associate Professor Department of Biochemistry³, Rafsanjan University of Medical Sciences, Professor Department of Physiology⁴, Tarbiyat Modarres University, Physiologist Shahrekord University of Medical Sciences⁵.

ABSTRACT

Introduction: The Blood flow increases in the inflamed joint induced by Complete Freund's Adjuvant (CFA). Since the anti-inflammatory effect of calcium channel blockers have been shown in pervious studies, the present study investigates the role of these blockers on the blood flow and temperature (inflammation indices) in inflamed knee joint induced by CFA.

Methods: This experimental study was carried out in 8 groups of adult male rats. In group I, 0.2 ml of CFA solution was injected into the right knee, and group II received the same volume of normal saline. Group III to VIII received the same volume of CFA solution, but seven days after injection of CFA to the end of study, received the following drugs orally by oropharyngeal tubes. Group III dimethylsulfoxide (the drugs solvent), group IV and V received low dose (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) of verapamil and nifedipine respectively. Group VI and VII received high dose (800 $\mu\text{g}/\text{kg}$) of verapamil and nifedipine respectively, and group VIII was treated with ibuprofen (15mg/kg). The changes in blood flow and local temperature of the animal's knee joint were measured for 28 days after CFA injection.

Results: CFA injection increased blood flow significantly in all 28 days compared to day zero, where as at seventh day increase in blood flow was 121.8 ± 6.1 percent. Low dose of verapamil and nifedipine increased CFA-induced blood flow. The high dose of verapamil and nifedipine also diminished the blood flow of the knee. The inhibition effect of these blockers on knee joint blood flow was comparable to ibuprofen. Decrease in temperature by different doses of verapamil and nifedipine were not significant.

Conclusion: The results of this study show that calcium channel blockers inhibit the increased blood flow and temperature in chronic inflammation induced by CFA injection in the inflamed region. So these blockers possibly reduce the chronic inflammation by this mechanism.

Key words: Rats – Knee Joint – Blood Flow Velocity - Inflammation – Calcium Channel Blockers

Correspondence:

M. Khaksari Hadad,
PhD.

Department of Physiology
& Pharmacology.
Kerman University of
Medical Sciences.

Kerman, Iran

Tel: +98 341 3224615

Email:

khaksar38@yahoo.co.uk

کاهش جریان خون و درجه حرارت مفصل زانوی موش صحرایی به وسیله مهارکننده‌های کانال کلسیم در شرایط التهاب مزمن

دکتر محمد خاکساری حداد^۱، محمدرضا رحمانی^۲، دکتر غلامرضا اسدی کرم^۳، دکتر سهراب حاجی‌زاده^۴، مهرداد شهرانی^۵
^۱ استاد گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان^۲، مربی گروه فیزیولوژی،^۳ دانشیار گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان^۴ استاد گروه فیزیولوژی، دانشگاه تربیت مدرس تهران^۵ کارشناس پژوهشی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

مجله پزشکی هرمزگان سال دهم شماره سوم پاییز ۸۵ صفحات ۳۲۹-۳۲۰

چکیده

مقدمه: در التهاب مزمن ایجاد شده در مفصل زانو توسط اجوات کامل فروند (CFA) جریان خون افزایش می‌یابد. از آنجایی که در مطالعات قبلی اثر ضدالتهابی مسدودهای کانال کلسیم گزارش شده است، در مطالعه حاضر نقش این مهارکننده‌ها بر روی شاخص‌های التهاب جریان خون و درجه حرارت در مفصل زانوی ملتهب ناشی از تزریق اجوات، مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار: این مطالعه تجربی بر روی ۸ گروه موش صحرایی نر بالغ انجام شد. گروه I در زانوی راست آنها ۰/۱ ml محلول اجوات کامل فروند (CFA) *Complete Freund's Adjuvant*، گروه II هم حجم CFA، سالین در زانوی آنها تزریق شد. گروه III به آنها CFA تزریق شده و از روز هفتم تا پایان مطالعه هم حجم داروهای مصرفی، دی‌متیل سولفوکسید را به صورت خوراکی دریافت کردند و گروه‌های IV و V به ترتیب نوز اندک و وراپامیل و نیفیدپین و گروه‌های VI و VII به ترتیب نوز زیاد و وراپامیل و نیفیدپین از روز هفتم تا پایان مطالعه به صورت خوراکی دریافت کردند. گروه VIII ایوپروفن را با نوز ۱۵ mg/kg از روز هفتم مطالعه، روزانه به صورت خوراکی مصرف کردند. تغییرات جریان خون و تغییرات درجه حرارت موضعی مفصل با استفاده از دستگاه جریان سنخ‌لیزری برای مدت ۲۸ روز بعد از تزریق CFA اندازه‌گیری شد. برای تجزیه و تحلیل آماری از آزمونهای آنالیز واریانس و استفاده شد.

نتایج: تزریق CFA به طور معنی‌داری در تمام ۲۸ روز نسبت به روز صفر جریان خون را افزایش نشان داد، به طوری که در روز هفتم، افزایش ۱۲۱/۷±۶/۱ درصدی در جریان خون را موجب می‌شد. مصرف نوز اندک و وراپامیل و نوز اندک نیفیدپین جریان خون افزایش یافته ناشی از تزریق CFA منجر شدند. مصرف نوزهای زیاد و وراپامیل و نیفیدپین نیز باعث کاهش جریان خون مفصل شدند. اثر مهارتی این مهارکننده‌ها بر جریان خون مفصل با اثر ایوپروفن قابل مقایسه بود. در خصوص درجه حرارت مفصل ملتهب، نوز اندک و وراپامیل و نیفیدپین و نوز زیاد نیفیدپین و وراپامیل اعمال نموده‌اند. تفاوت معنی‌دار بین نوزهای مختلف مسدودها با ایوپروفن در کاهش درجه حرارت مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه معرف این می‌باشد که داروهای مهارکننده کانال کلسیم در شرایط التهاب مزمن ناشی از تزریق CFA، افزایش جریان خون و درجه حرارت در موضع التهاب را مهار نموده و احتمالاً از این طریق التهاب مزمن را کاهش می‌دهد.

کلیدواژه‌ها: موشهای صحرایی - غضروف زانو - سرعت جریان خون - التهاب - مهارکننده کانال کلسیم

نویسنده مسئول:

دکتر محمد خاکساری حداد
گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی
دانشگاه علوم پزشکی کرمان
کرمان - ایران
تلفن: +۹۸ ۳۴۱ ۳۲۲۴۶۱۵
پست الکترونیکی:
Khaksar38@yahoo.co.uk

دریافت مقاله: ۸۴/۷/۱۹ اصلاح نهایی: ۸۴/۱۰/۵ پذیرش مقاله: ۸۵/۲/۶

مقدمه:

یکی از تغییراتی که در التهاب مزمن وجود دارد، گشاد شدن عروق مفصل مبتلا و افزایش جریان خون در آن می‌باشد، به طوری که همین تغییر یکی از عوامل اصلی افزایش درجه حرارت و خیز التهابی می‌باشد (۲). غضروفهای مفصلی برای تأمین نیاز اکسیژن و مواد غذایی خود به مایع سینوویال وابسته‌اند، این مایع از جریان خون مفصل منشأ می‌گیرد، بنابراین عوامل تنظیم‌کننده جریان خون مفصل می‌توانند در حفظ سلامت

آرتريت روماتوئید یک بیماری التهابی مزمن در مفاصل می‌باشد که یک درصد جمعیت انسانی را مبتلا نموده که بسته به منطقه جغرافیایی تا حدودی متغیر است. با وجود مطالعات زیاد در چند سال اخیر، روشهای درمانی جدید، مناسب و با تأثیر زیاد برای درمان آرتريت روماتوئید معرفی نشده است (۱).

(۱۴)، تولید و ساخت NO (۱۵)، رهایش اینترلوکین‌ها، رهایش میانجی‌ها از طریق روند اگزوسیتوز، افزایش مهاجرت یاخته‌های التهابی به محل التهاب (۱۶) نقش دارد. از سوی دیگر گزارش شده است که مهارکننده‌های کانال‌های ولتاژی کلسیم باعث مهار تولید NO و آنزیم‌های سازنده پروستاگلاندین‌ها (۱۷)، کاهش رهایش هیستامین، برادی‌کینین، سروتونین، متابولیت‌های اسید آراشیدونیک و لوکوترین‌ها (۱۸) می‌شوند.

با توجه به نقش کلسیم در پیدایش عوامل دخیل در التهاب که در فوق بیان شد، این فرضیه مطرح می‌شود که شاید مهارکننده‌های کلسیم در درمان التهاب مؤثر باشند و به همین لحاظ در مطالعات قبلی اثر مسددهای کانال‌های کلسیم در التهاب حاد (۱۹) و مزمن (۲۰) بررسی و نقش مهار آنها نشان داده شد؛ بنابراین در پژوهش حاضر این فرضیه مورد آزمون قرار می‌گیرد که آیا اثر ضدالتهابی این مسددها در التهاب مزمن زانوی موش صحرایی از طریق کاهش جریان خون و کاهش درجه حرارت واسطه می‌شود و علاوه بر این اثرات آنها بر روی جریان خون و درجه حرارت با اثر ایبوپروفن (داروی ضدالتهابی استاندارد) مقایسه می‌شود.

روش کار:

۱- حیوان‌ها:

این مطالعه مداخله‌ای - تجربی روی ۸۰ موش صحرایی (rat) بالغ نر نژاد آلبینو ماری با وزن ۲۰۰-۲۵۰ گرم انجام گرفت. حیوان‌ها در حیوان‌خانه دانشکده پزشکی رفسنجان با درجه حرارت ۲۰-۲۳ درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی - روشنایی ۱۲ ساعت نگهداری شدند و آب و غذا آزادانه در اختیار آنها بود. پروتکل آزمایش به روش زیر به طور یکسان روی همه گروه‌ها اجرا شد.

۲- روش ایجاد التهاب مزمن:

برای ایجاد التهاب مزمن در زانو پس از ایجاد بیهوشی با اتر، ۰/۲ میلی‌لیتر از محلول اجوانت کامل فروند Complete Freund's Adjuvant (CFA) با سرنگ انسولین به شماره ۲۶ به فضای قدامی مفصل زانوی راست حیوان تزریق شد. استفاده از این روش یک مدل پذیرفته شده برای التهاب مزمن است که واکنش‌های التهابی شبیه آرتریت روماتوئید در انسان ایجاد می‌کند (۲۰، ۲۱). CFA

یافته‌های مفصلی و نگهداری یک محیط ثابت و پایدار در داخل مفصل نقش اساسی داشته باشند (۳). تغییر مکانیسم‌های طبیعی تنظیم‌کننده جریان خون بافت سینوویال به وسیله بیماری‌های التهابی مفاصل می‌تواند در روند تخریب بافت سینوویال دخالت داشته باشند (۴). مکانیسم مسئول افزایش جریان خون در مفصل با التهاب مزمن هنوز به طور کامل شناخته نشده است؛ اگرچه گزارش شده است که افزایش جریان خون در این مفاصل احتمالاً ناشی از کاهش در تون سمپاتیکی عروق (۵)، تغییر در نیم‌رخ (Profile) گیرنده‌های بتا-آدرنژیک (۶) کاهش پاسخ‌دهی عروق زانو به فنیل‌افرین و تولید بیش از حد اکسیدنیتریک (NO) می‌باشد (۴). اما چیزی که مشخص شده است، این می‌باشد که تغییر در جریان خون می‌تواند ناشی از تغییر در تولید و رهایش میانجی‌های شل‌کننده عروقی موضعی از یاخته‌های ملتهب یا از انتهای اعصاب حسی باشد، به طوری که CGRP و ماده P که از انتهای اعصاب حسی رها می‌شوند، باعث گشاد شدن نورونیک عروق می‌شوند (۷، ۸)، علاوه بر این در مفصل ملتهب رهایش بیشتر ماده P و تنظیم افزایش گیرنده‌های این ماده محتمل است، همچنین برای کینین، پروستاگلاندین‌ها خصوصاً PGE₂ و PGI₂ (۹)، هیستامین و اکسید نیتریک (۱۰) که به صورت موضعی رها می‌شوند، در افزایش جریان خون نقش دارند. هم التهاب حاد و هم التهاب مزمن به طور ثانویه باعث افزایش درجه حرارت می‌شوند (۱۱)، به طوری که گرما و تورم به عنوان دو علامت مهم بالینی التهاب، مطرح شدند. بنابراین داروهایی که هم تورم و هم درجه حرارت را کاهش می‌دهند، به عنوان ضدالتهاب مطرح شده‌اند (۱۲). یکی از مکانیسم‌های افزایش درجه حرارت، افزایش جریان خون مفصل می‌باشد. اگرچه بعضی از میانجی‌های شیمیایی که در محل التهاب آزاد می‌شوند (۱۳) نیز می‌توانند افزایش درجه حرارت را موجب شوند. لذا عواملی که جریان خون مفصل را کاهش داده یا تولید و رهایش میانجی‌ها را مهار نمایند، احتمالاً در کاهش درجه حرارت مفصل ملتهب نیز مؤثر هستند.

یون کلسیم در رهایش بسیاری از میانجی‌های التهابی فوق، فعال شدن آنها و یا ایجاد اثرات آنها از قبیل فعال کردن PLA₂ و افزایش محصولات مسیر اسید آراشیدونیک

ترکیبی از سوسپانسیون مایکوباکتریوم توبر کلوزیس کشته و خشک شده در روغن معدنی می باشد (۲۱،۲۲).

۳- روشهای اندازه گیری تأثیرات مسددها در مفصل ملتهب: به دو روش زیر میزان اثر مسددهای کانال کلسیم در زانوی ملتهب مورد بررسی قرار گرفت:

الف) اندازه گیری تغییرات جریان خون:

برای اندازه گیری میزان تغییرات جریان خون در پاسخ به تزریق CFA و داروی مصرف شده در این مطالعه، حیوانها توسط تزریق داخل صفاقی (i.p) اورتان به میزان ۱/۵g/kg دچار بیهوشی عمیق شدند. پس از اطمینان از بیهوشی عمیق حیوان که از طریق از بین رفتن بازتاب عقب کشیدن اندام خلفی در پاسخ به وارد آمدن محرکهای دردناک به پنجه، سنجیده می شد، اندازه گیری روی آنها انجام می شد. برای اندازه گیری تغییرات جریان خون از دستگاه جریان سنج لیزری دوکاناله مدل (DRT4 Moor Instrument، انگلستان) استفاده شده که مطالعات دیگران در موش صحرایی (۸) این روش را مورد تأیید قرار داده بودند. پروب دستگاه درست در تماس با سطح داخلی کپسول زانو قرار داده شد و از ۲۰ نقطه به وسعت یک میلی متر مربع ثبت انجام گرفت و ۲ تا ۳ بار این عمل تکرار شده و نهایتاً میانگین (arbitrary) آنها در نظر گرفته شد. تغییرات جریان خون در روزهای صفر (قبل از تزریق)، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ پس از تزریق CFA و بعد از تجویز خوراکی مسددهای کانال کلسیم با استفاده از این دستگاه کنترل گردید و با یکدیگر مقایسه شدند. در نهایت حیوان با غلظت بالای اورتان کشته شده و ثبت جریان پایه بافت مفصل به منظور به دست آمدن سطح صفر بیولوژیک (Biological Zero Level (BZL) انجام شد تا از مقدار اندازه گیری شده در حین آزمایش کسر گردد (۴).

ب) اندازه گیری میزان تغییرات درجه حرارت:

در این مطالعه شاخص دیگری که مورد بررسی قرار گرفت، درجه حرارت مفصل ملتهب بود. روش کار مشابه روش اندازه گیری جریان خون می باشد و با همان پروب که جریان خون مفصل اندازه گیری می شد، درجه حرارت نیز در روزهای مختلف مطالعه (۰، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸) اندازه گیری شد.

۴- داروهای مصرفی:

اجوانت کامل فروند (بیورن، مشهد) و راپامیل و نیفدیپین (اهدایی شرکت رز دارو، ایران) که با دوزهای ۱۰۰ $\mu\text{g}/\text{kg}$ و ۸۰۰ و ایبوپروفن (Sigma Co.UK) با دوز ۱۵mg/kg

به صورت خوراکی از طریق لوله دهانی معدی از روز هفتم بعد از تزریق CFA به حیوانها داده شد. اثر مهارى این داروها بر التهاب، دوز استفاده شده در مطالعات قبلی اثر مهارى آنها بر روى التهاب گزارش شده بود (۱۹،۲۰). داروهای مصرف شده در این مطالعه در دی متیل سولفوکسید {Merck (DMSO)، آلمان} حل شدند (۲۰). حجم محلولهای مصرفی ۱ ml/kg بود و محلولها توسط فردی مشخص و در ساعت معین از روز هفتم بعد از تزریق CFA (شروع التهاب مزمن) برای مدت ۲۱ روز به حیوانها خوراندند. DMSO نیز به عنوان حلال به صورت هم حجم با داروهای فوق به صورت خوراکی مصرف شد. اورتان و اثر (Merck، آلمان) جهت ایجاد بیهوشی نیز استفاده شدند.

۵- گروههای آزمایشی:

موشها به طور تصادفی آسان به ۸ گروه زیر تقسیم شدند و در هر گروه ۱۰-۸ سر حیوان وجود داشت:

گروه I: حیوانهایی که در اثر تزریق CFA دچار التهاب مزمن زانو شده اند و تغییرات میزان جریان خون و درجه حرارت مفصل در آنها برای ۲۸ روز اندازه گیری شد.

گروه II: در این گروه هم حجم CFA یعنی ۰/۲ml سرم فیزیولوژیک (سالین) در زانوی راست آنها تزریق شد و تغییرات مشابه با گروه I در اینها نیز بررسی شد.

گروه III: در این گروه CFA تزریق شد و حلال داروها یعنی DMSO از روز هفتم به حیوانها خوراندند شد و تغییرات میزان جریان خون و درجه حرارت مفصل در آنها برای ۲۱ روز اندازه گیری شد.

گروه IV: در این گروه وراپامیل با دوز ۱۰۰ $\mu\text{g}/\text{kg}$ برای ۲۱ روز داده شد و موارد مشابه با گروه III اندازه گیری شد.

گروه V: در این گروه نیفدیپین با دوز ۱۰۰ $\mu\text{g}/\text{kg}$ برای ۲۱ روز داده شد و موارد مشابه با گروه III اندازه گیری شد.

گروه VI: در این گروه وراپامیل با دوز ۸۰۰ $\mu\text{g}/\text{kg}$ برای ۲۱ روز داده شد و موارد مشابه با گروه III اندازه گیری شد.

گروه VII: در این گروه نیفدیپین با دوز ۸۰۰ $\mu\text{g}/\text{kg}$ برای ۲۱ روز داده شد و موارد مشابه با گروه III اندازه گیری شد.

گروه VIII: در این گروه ایبوپروفن با دوز 15 mg/kg برای 21 روز داده شد و موارد گروه III در آنها بررسی شد. 6- روش آماری:

نتایج به دست آمده با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و به دنبال آن از آزمون Tukey و در مواردی Student t-test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتایج همه آزمایشها به صورت میانگین و خطای معیار نشان داده شده و $P < 0.05$ اختلاف معنی داری منظور گردید.

نتایج:

الف) نتایج حاصل از تغییرات جریان خون: اثرات CFA، سالین و DMSO+CFA و همچنین دوزهای کم و زیاد وراپامیل و نیفدیپین بر روی جریان خون مفصل زانو در روزهای مختلف مطالعه در جدول شماره 1 نشان داده شده است. تزریق CFA باعث افزایش معنی دار جریان خون در همه روزهای 7، 14، 21 و 28 در مقایسه با روز صفر می شود ($P < 0.01$). علی رغم اینکه در روز صفر مقدار جریان خون در گروههای CFA، سالین و DMSO یکسان است (99/4±9/5) اما در روز هفتم بعد از تزریق CFA میزان جریان خون در گروه CFA به طوری معنی داری بیشتر از گروه سالین شده است (به ترتیب 229/8±13/2 در مقایسه با 102±7/9، $P < 0.001$). این افزایش جریان خون ناشی از CFA تا پایان مطالعه (روز 28) نیز حفظ شده است (163/7±12/4). از سوی دیگر DMSO (حلال

داروهای مصرفی) نه در روز هفتم و نه در روزهای دیگر مطالعه، اثر معنی داری بر روی افزایش جریان خون ناشی از CFA نداشتند؛ علاوه بر این، این جدول نشان می دهد که دوزهای اندک وراپامیل و نیفدیپین (100 μg/kg) و همچنین دوزهای زیاد این داروها (800 μg/kg) توانسته اند افزایش جریان خون را در مقایسه با گروههای CFA و DMSO به طور معنی داری در روزهای 14 و 21 مطالعه کاهش دهند ($P < 0.001$) که بیشترین اثر کاهشی در روز 21 مشاهده شد، در حالی که در روز 28 مطالعه اگرچه هر دو دوز مصرفی نیفدیپین افزایش جریان خون را مهار نموده اند ($P < 0.001$)، اما در این روز فقط دوز اندک وراپامیل مؤثر بوده است. ایبوپروفن نیز در همه روزهای 14، 21 و 28 مطالعه افزایش جریان خون ناشی از CFA را به طور معنی داری مهار نموده است ($P < 0.001$). اگرچه در روزهای 14 و 21 ایبوپروفن و دوزهای مختلف مسدودها اختلاف معنی دار وجود ندارد، اما در روز 28 بین ایبوپروفن و وراپامیل 800 اختلاف معنی دار وجود دارد ($P < 0.001$). در روز 28 مطالعه اثرات مهار دوز زیاد وراپامیل کاهش یافته است، به طوری که اختلاف معنی دار بین CFA و دوز زیاد وراپامیل وجود ندارد و از سوی دیگر بین دوز اندک و زیاد وراپامیل اختلاف معنی دار وجود دارد ($P < 0.001$).

جدول شماره 1- مقایسه اثرات داروهای مختلف بر روی میزان جریان خون (arbitrary) مفصل زانوی موش صحرایی در

گروههای مختلف مطالعه

روز	گروه	0	7	14	21	28
	CFA	99/4±9/5	229/13±8/2	217/11±1/5 ^b	244/10±8/4 ^c	163/11±7/4 ^d
	سالین	99/3±8/7 ^a	102/7±1/9	101/1±1/6 ^a	93/1±2/4 ^a	97/5±8/6 ^a
	DMSO	98/4±9/6	230/14±5/1	199/13±9/7	6±222	195/16±9/9
	نیفدیپین-100	-	240/10±9/5	159/10±2/9	121/8±3/7	124/6±1/9
	وراپامیل-100	-	239/12±4/7	135/21±2/4	112/10±1/1	96/5±8/1
	نیفدیپین-800	-	230/14±5/5	144/13±7/7	132/11±7/5	127/8±1/7
	وراپامیل-800	-	222/12±8/5	136/14±8/1	148/15±1	158/10±2/4
	ایبوپروفن	-	15±225/4	176/9±2/5	108/2±1/8	95/5±6/8

اختلاف معنی‌دار بین درجه حرارت مفصل زانو در گروه‌های CFA، سالین و DMSO وجود ندارد (به ترتیب $26/51 \pm 0/58$ ، $27/2 \pm 0/4$ و $27/5 \pm 0/52$).

در روز هفتم بعد از تزریق CFA درجه حرارت مفصل زانو در گروه CFA ($35/0 \pm 17/1$) در مقایسه با گروه دریافت‌کننده سالین ($26/92 \pm 0/32$) به طور معنی‌داری افزایش یافته است ($P < 0/001$) که این اختلاف معنی‌دار بین این دو گروه تا پایان مطالعه وجود داشت ($P < 0/001$). اگرچه DMSO حلال داروهای مصرفی، اثر مهاری معنی‌دار بر روی افزایش درجه حرارت ناشی از CFA در روز ۱۴ نداشت، اما در روزهای ۲۱ ($32/37 \pm 0/29$) و ۲۸ ($31/0 \pm 21/19$) اختلاف معنی‌دار بین این دو گروه وجود دارد ($P < 0/001$).

این نتایج همچنین نشان می‌دهد که هم دوز اندک و هم دوز زیاد هر دو مسدود کانال کلسیم به طور معنی‌داری افزایش درجه حرارت مفصل ناشی از CFA را در روزهای ۱۴، ۲۱ و ۲۸ مهار نموده‌اند ($P < 0/001$). همچنین در روزهای ۱۴، ۲۱ و ۲۸ بین دوز اندک و زیاد نیفدیپین اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($P < 0/001$).

- اختلاف معنی‌دار بین گروه سالین با CFA و یا DMSO در همه روزهای مطالعه مشاهده شد ($P < 0/001$).

- اختلاف معنی‌دار بین دوزهای مختلف وراپامیل، نیفدیپین یا ایبوپروفن با گروه CFA در روز ۱۴ با $P < 0/001$.

- اختلاف معنی‌دار بین دوزهای مختلف وراپامیل، نیفدیپین یا ایبوپروفن با گروه CFA در روز ۲۱ مشاهده شد ($P < 0/001$).

- اختلاف معنی‌دار بین دوز اندک وراپامیل دوزهای مختلف نیفدیپین و ایبوپروفن با گروه CFA در روز ۲۸ وجود دارد ($P < 0/001$).

ب) نتایج حاصل از تغییرات درجه حرارت مفصل زانو:

اثرات CFA، سالین، DMSO و همچنین دوزهای کم و زیاد وراپامیل و نیفدیپین و ایبوپروفن بر روی میزان درجه حرارت مفصل زانوی حیوان در روزهای مختلف مطالعه در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. نتایج این جدول معرف این هستند که تزریق CFA باعث افزایش درجه حرارت در روزهای ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ مطالعه می‌شود ($P < 0/001$). در روز صفر مطالعه

جدول شماره ۲- مقایسه اثرات داروهای مختلف بر روی میزان درجه حرارت (سانتی‌گراد) مفصل زانو در گروه‌های مختلف و در روزهای مختلف مطالعه

روز	۰	۷	۱۴	۲۱	۲۸
گروه CFA	۲۶/۱۵۸±۵۱ ^a	۳۵/۰±۱۷/۱	۳۴/۰±۸/۳۵	۳۴/۰±۱۶/۰۹	۳۴/۰±۲۵/۲۵
سالین	۲۷/۰±۲/۴	۲۶/۰±۹۲/۳۳ ^b	۲۶/۰±۲۶/۱۷	۲۶/۰±۲۹/۲۹	۲۶/۰±۷۱/۳۱
DMSO	۲۷/۰±۵/۵۲	۳۵/۰±۲/۴	۳۳/۰±۸۵/۳۵	۳۲/۰±۳۷/۲۹ ^c	۳۱/۰±۲۱/۱۹
نیفدیپین-۱۰۰	-	۳۵/۰±۳/۲۱	۲۹/۰±۹۷/۲۱ ^d	۳۰/۰±۱۹/۲۶	۳۰/۰±۲۵/۲۴
وراپامیل-۱۰۰	-	۲۴/۰±۹۱/۳۵	۲۸/۰±۳۸/۶۶ ^e	۲۸/۰±۹۶/۱۸	۲۸/۰±۷۳/۱۴
نیفدیپین-۸۰۰	-	۳۵/۰±۲/۴	۳۰/۰±۶۵/۳۹ ^f	۲۹/۰±۲۷/۲۱	۲۹/۰±۳۲/۳۸
وراپامیل-۸۰۰	-	۳۵/۰±۵/۶۵	۲۸/۰±۸/۲۴ ^g	۲۹/۰±۶۳/۴۷	۲۹/۰±۹۱/۳۱
ایبوپروفن	-	۳۵/۰±۵/۲	۲۹/۰±۹/۲۳ ^h	۲۹/۰±۴/۱۲	۲۸/۰±۱/۴

- اختلاف معنی‌دار بین نیفدیپین ۱۰۰ با گروه CFA در روزهای ۱۴، ۲۱ و ۲۸ مشاهده شد ($P < 0.001$).
 - اختلاف معنی‌دار بین وراپامیل ۱۰۰ با CFA در روزهای ۱۴، ۲۱ و ۲۸ مشاهده شد ($P < 0.001$).
 - اختلاف معنی‌دار بین دوز زیاد نیفدیپین با CFA در روزهای ۱۴، ۲۱ و ۲۸ مشاهده شد ($P < 0.001$).
 - اختلاف معنی‌دار بین دوز زیاد وراپامیل با CFA در روزهای ۱۴، ۲۱ و ۲۸ مشاهده شد ($P < 0.001$).
 - اختلاف معنی‌دار بین ایبوپروفن با CFA در روزهای ۱۴، ۲۱ و ۲۸ مشاهده شد ($P < 0.001$).

بحث و نتیجه‌گیری:

مطالعات قبلی نقش مهاری مسددهای کانال کلسیم را در التهاب حاد (۱۹) و مزمن (۲۰) نشان داده‌اند. با توجه به اینکه یکی از تغییرات در التهاب که منجر به حوادث پاتولوژیک می‌شود، افزایش جریان خون در مفاصل ملتهب می‌باشد (۲). در مطالعه حاضر نیز اثرات این مهارکننده‌ها روی تغییرات جریان خون و درجه حرارت مفصل ملتهب مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج این مطالعه نشان داد که تزریق داخل مفصلی CFA باعث افزایش معنی‌دار جریان خون مفصل از روز اول می‌شود، به طوری که در روز هفتم پس از تزریق، جریان خون در زانوی تزریق شده به میزان $121/7 \pm 6/1$ درصد افزایش در مقایسه با روز صفر را نشان داد، سپس به تدریج در روزهای بعد اندکی کاهش پیدا می‌کند ولی هرگز به مقدار اولیه خود نمی‌رسد و تا انتهای

به طور مثال در روز ۲۸، درجه حرارت مفصل در گروه دوز اندک و زیاد نیفدیپین $24/25 \pm 0/24$ درجه سانتی‌گراد و در گروه دوز زیاد نیفدیپین $29/32 \pm 0/38$ است. علاوه بر این در روزهای ۲۱ و ۲۸ بین دوز اندک و زیاد وراپامیل اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($P < 0.001$). در روزهای ۱۴، ۲۱ و ۲۸ مطالعه بین دوز اندک وراپامیل و دوز اندک نیفدیپین اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($P < 0.001$). همچنین در روزهای ۱۴ و ۲۸ بین دوز زیاد وراپامیل و دوز زیاد نیفدیپین اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($P < 0.001$). ایبوپروفن در روزهای ۱۴، ۲۱ و ۲۸ مطالعه در مقایسه با گروه CFA درجه حرارت مفصل زانو را کاهش داده است ($P < 0.001$).

در روز ۱۴ مطالعه بین ایبوپروفن با نیفدیپین ۸۰۰ و دوزهای اندک و زیاد وراپامیل ($P < 0.001$) و در روز ۲۱ بین ایبوپروفن با دوز اندک نیفدیپین ($P < 0.05$) و دوز اندک وراپامیل ($P < 0.05$) و در روز ۲۸ بین ایبوپروفن با دوز اندک و زیاد نیفدیپین ($P < 0.001$) و همچنین دوز اندک و زیاد وراپامیل ($P < 0.001$) اختلاف معنی‌دار وجود دارد.

بر اساس نتایج بدست آمده:

- اختلاف معنی‌دار بین روز صفر با روزهای ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ مطالعه مشاهده گردید ($P < 0.001$).
 - اختلاف معنی‌دار در روزهای ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ بین گروه CFA با گروه سالین مشاهده گردید ($P < 0.001$).
 - اختلاف معنی‌دار بین گروه CFA با DMSO با روزهای ۲۱ و ۲۸ مشاهده شد ($P < 0.001$).

مطالعه دارای اختلاف معنی‌دار با روز صفر است ($93/15 \pm 8/5$) درصد افزایش در روز بیست و هشتم). افزایش جریان خون به وسیله CFA با افزایش حجم پنجه (۲۰) و افزایش قطر زانوی ملتهب (۴) توسط این ماده همخوانی دارد. CFA احتمالاً از طریق افزایش تولید پروستاگلاندین‌ها، تجمع فاگوسیت‌ها در مفاصل و تولید رادیکالهای آزاد اکسیژن و سایر مواد مؤثر بر قطر عروق (۲۲) افزایش جریان خون را در مفصل با التهاب مزمن موجب شده است.

مصرف خوراکی هر دو مهارکننده کانال کلسیم، افزایش جریان خون ناشی از CFA را در مفصل زانو را کاهش دادند، به طوری که دوز اندک وراپامیل در روزهای ۱۴، ۲۱ و ۲۸ به ترتیب کاهش $26/8 \pm 7/1$ ، $37/10 \pm 6$ و $58/2 \pm 3/2$ درصد و دوز اندک نیفدیپین در همین روزها به ترتیب کاهش $27/3 \pm 5/2$ ، $43/7 \pm 4/1$ و $37/5 \pm 5/9$ درصدی در جریان خون را باعث شدند. مصرف دوزهای زیاد وراپامیل با نیفدیپین نیز در روزهای فوق باعث کاهش جریان خون مفصل شدند، به طوری که بیشترین اثر مهارتی وراپامیل ($34/6 \pm 6/6$) درصد) و نیفدیپین ($42/9 \pm 3/8$) درصد) در روز ۱۴ اعمال شده است. اثر مهارتی این مهارکننده‌ها بر روی این شاخص التهاب، با اثر ایبوپروفن قابل مقایسه بود. بنابراین گشاد شدن عروق ناشی از تزریق CFA که تحت شرایط التهاب مزمن به وجود می‌آید، به میزان معنی‌داری به وسیله مهارکننده‌های کانال کلسیم کاهش می‌یابد. که این نشان دهنده نقش کلسیم در این پاسخ عروقی می‌باشد. مسددهای کانال کلسیم احتمالاً از طریق تغییر در تولید و رهایش CGRP و ماده P از انتهای اعصاب حسی (۷،۸)، مهار آنزیم PLA₂ و به دنبال آن کاهش تولید PGE₂ و PGI₂ (۹،۱۷)، مهار PKC وابسته به کلسیم و در نتیجه مهار مسیرهایی که توسط این آنزیم فعال می‌شود (۱۴)، مهار رهایش با عملکرد میانجی‌های شیمیایی از قبیل هیستامین، برادی‌کینین، سروتونین، لوکوترین‌ها (۱۸) یا کاهش تولید رادیکالهای آزاد اکسیژن و سوپراکسیدها (۲۳)، اثرات مهارتی خود را اعمال نموده‌اند. همچنین از آنجایی که در مطالعات قبلی مشخص شده است که میزان تولید NO در بیماریهای التهابی افزایش می‌یابد و از سوی دیگر پاسخ ماهیچه

صاف عروق به آنتاگونیست‌های گیرنده آلفا تحت تأثیر NO رها شده از اندوتلیوم عروق قرار می‌گیرد (۴)، بنابراین شاید مسددهای کانال کلسیم از طریق تغییر در تولید NO (۱۵) باعث کاهش جریان خون شده باشند. از سوی دیگر گزارش شده است که در التهاب حاد (۲۴) و مزمن (۲۵) در زانوی موش صحرایی پاسخ انقباضی به تحریک عصب سمپاتیک زانو کاهش می‌یابد، لذا شاید این مهارکننده‌های کانال کلسیم با ایجاد تغییرات موضعی در مفصل ملتهب، از این کاهش پاسخ‌دهی جلوگیری نموده باشند. شاید بتوان بیان کرد که اثر مستقیم مهارکننده‌های کانال کلسیم بر روی عروق، مهار انقباض عضله صاف دیواره آنها و در نتیجه گشاد شدن عروق و کاهش جریان خون می‌باشد.

نتایج بخش دیگر این پژوهش نشان داد که دوز اندک وراپامیل و نیفدیپین بیشترین اثر مهارتی خود را برای کاهش درجه حرارت مفصل ملتهب به ترتیب به میزان $12/1 \pm 0.5/2$ درصد در روز ۱۴ و دوز زیاد نیفدیپین و وراپامیل بیشترین اثر مهارتی خود را به ترتیب به میزان $16/1 \pm 1/5$ درصد و $15/2 \pm 1/7$ درصد در روز ۲۱ مطالعه اعمال نموده‌اند. مهارکننده‌های کانال کلسیم احتمالاً از طریق کاهش NO (۲۶)، مهار رهایش میانجی‌های عصبی از قبیل گابا (۲۷)، کاهش رهایش اینترلوکین‌ها (۲۸)، کاهش پروستاگلاندین‌ها (۲۹)، یا کاهش جریان خون که در مطالعه حاضر مشاهده شد، کاهش درجه حرارت مفصل ملتهب را موجب شده‌اند. اثر مفید مهارکننده‌های کانال کلسیم بر روی کاهش درجه حرارت یا گزارش‌هایی که در مورد اثر مفید این داروها بر کاهش درجه حرارت در حیوان‌های فاقد تخمدان (۱۳)، سندرم Raynaud (۳۰) و پنجه ملتهب (۲۹) وجود دارد، مطابقت می‌نماید.

در مجموع پژوهش حاضر نشان داد که هم وراپامیل و هم نیفدیپین دارای اثر قوی و قابل ملاحظه‌ای برای کاهش جریان خون و درجه حرارت مفصل با التهاب مزمن می‌باشند و اثر ضدالتهابی که برای این داروها گزارش شده است (۱۹،۲۰)، احتمالاً از طریق کاهش جریان خون و کاهش درجه حرارت اعمال شده است. همچنین این مطالعه نشان داد که کلسیم در ایجاد آرتريت روماتوئید دخیل می‌باشد و اینکه مهارکننده‌های کانال

کلسیم می‌توانند به عنوان نسل جدیدی از داروهای مؤثر بر این اختلال مزمن معرفی شوند که برای صحت این ادعا پیشنهاد می‌شوند که کارآزمایی بالینی انجام شود.

سپاسگزاری:

این پژوهش به عنوان طرح تحقیقاتی در شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان تصویب شده و از حمایت‌های مالی این دانشگاه برخوردار بوده است. لذا بدینوسیله از مسئولان ذیربط قدردانی به عمل می‌آید. همچنین پژوهشگران بر خود لازم می‌دانند از آقایان دکتر حمید نجفی و دکتر مهدی محمودی که در انجام این پژوهش همکاری داشتند، تقدیر و تشکر به عمل آورند.

References

منابع

1. Arend WP, Dayer JM. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1995;38(2):151-160.
2. Collins T. Acute and chronic inflammation. Cotran RS, V. Kumar, Collins T. In: Robbins pathologic basis of disease, 6th ed. Pennsylvania: W. B. Saunders, 1999.
3. Levick JR. Synovial fluid and trans - synovial flow in stationary and moving joints. In: Helminen K, Jurvelin J: Joint loading: biology and health of articular fractures. Bristol: John Wright; 1987.
4. بدوی، محمد. خوش‌باطن، علی. حاجی‌زاده، سهراب. نظری، فرزانه. کاهش پاسخ‌دهی عروق زانو موش صحرایی به تحریک گیرنده‌های آلفا-۱ آدرنرژیک در شرایط التهاب مزمن نقش نیتریک اکساید. مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی، ۱۳۷۹. شماره ۲. ص ۱۸۶-۱۷۵.
5. Najafipour H, Ferrell WR. Sympathetic innervation and alpha-adereno receptor profile of blood vessels in the posterior region of the rabbit knee joint. *Br J Pharmacol*. 1993;108(1):79-84.
6. نجفی‌پور، حمید. نیازمند، سعید. تأثیر التهاب مزمن بر گیرنده‌های بتا-آدرنرژیک عروقی مفصل زانو در خرگوش. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان. ۱۳۸۳. شماره ۴. ص ۲۰۵-۱۹۷.
7. Khoshbaten A, Ferrell WR. Responses of blood vessels in the rabbit knee to acute joint inflammation. *Ann Rheum Dis*. 1990;49:540-544.
8. Lam FY, Ferrell WR. CGRP modulates nerve-mediated vasoconstriction of rat knee joint blood vessels. *Ann N Y Acad Sci*. 1992;657:519-521.
9. Morgon .A, Knight D, O'Connor N. Lung water changes after thermal burns: an observational study. *Ann Surg*. 1978;187(3):288-293.
10. Kaur H, Halliwell B. Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation: nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett*. 1994;350:9-12.
11. Botrel MA, Haak T, Legrand C, Concordet D, Chevalier R, Toutain PL. Quantitative evaluation of an experimental inflammation induced with Freund's complete adjuvant in dogs. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1994;32:63-71.
12. Lees P, Mckellar QA, Foot R, Gettinby G. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of tolfenamic acid in ruminating calves: evaluation in models of acute inflammation. *Vet J*. 1998;155:275-288.

13. Leventhal L, Cosmi S, Deecher D. Effect of calcium channel modulators on temperature regulation in ovariectomized rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005;80:511-520.
 14. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and development of diabetic complications. *Diabetes.* 1998;47(6):859-866.
 15. Rezaie S, Rezaie A, Minaiee B, Khorasani R, Abdollahi M. On the relation of nitric oxide to nifedipine-induced gingival hyperplasia and impaired submandibular glands function in rats in vivo. *Fundam Clin Pharmacol.* 2005;19:65-71.
 16. Nakao S, Ogata Y, Modeer T, Furuyama S, Sugiya H. Bradykinin potentiates prostaglandin E(2) release in the gingival fibroblasts pretreated with interleukin-1 beta via Ca(2⁺) mobilization. *Eur J Pharmacol.* 2000;395(3):247-253.
 17. Shamimunisa B. Effects of calcium channel antagonists on LPS-included hepatic iNOS expression. *Am J Physiol.* 1999;40:351-360.
 18. Wirth KJ, Alpermann HG. The bradykinin antagonist HOE 140 inhibits carrageenan and thermally induced paw edema in rats. *Recent Progress on Kinin.* 1992;428-431.
 19. Khaksari M, Mahani SE, Mahmoodi M. Calcium channel blockers reduces inflammatory edema in rat: involvement of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Indian J Pharmacol.* 2004;36(6):351-354.
۲۰. خاکساری، محمد. سجادی، محمدعلی. زینلی زاده، مهدی. موسوی، مسعود. فعالیت ضدالتهابی مهارکننده‌های کانال کلسیم بر التهاب مزمن در موش صحرائی. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان. ۱۳۸۱، شماره ۲. ص ۶۷-۶۰.
21. McDougall JJ, Karimian SM, Ferrell WR. Alteration of substance P-mediated vasodilatation and sympathetic vasoconstriction in the rat knee joint by adjuvant-induced inflammation. *Neurosci Lett.* 1994;174:127-129.
 22. Fahim AT, Abd-el Fattah AA, Agha AM, Gad MZ. Effect of pumpkin-seed oil on the level of free radical scavengers induced during adjuvant-arthritis in rats. *Pharmacol Res.* 1995; 31(1):73-79.
 23. Sobal G, Menzel EJ, Sinzinger H. Calcium antagonists as inhibitors of in vitro low density lipoprotein oxidation and glycation. *Biochem Pharmacol.* 2001;61(3):373-379.
 24. Lam FY, and Ferrell WR. Acute inflammation in the rat knee joint attenuates sympathetic vasoconstriction but enhances neuropeptide-mediated vasodilation assessed by laser Doppler perfusion imaging. *Neuroscience.* 1993;52:443-449.
 25. McDougall J, Karimian SM, Ferrell WR. Prolonged alteration of vasoconstrictor and vasodilator responses in rat knee joints by adjuvant monoarthritis. *Exp Physiol.* 1995;80:349-357.
 26. Rawls SM, Tallarida RJ, Gray AM, Geller EB, Adler MW. L-Name, a nitric oxide synthase inhibitor and WIN 55212-2, a cannabinoid agonist, interact to evoke synergistic hypothermia. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;308:780-786.
 27. Rawls SM, Tallarida RJ, Kon DA, Geller EB, Adler MW. GABAA receptors modulate cannabinoid-evoked hypothermia. *Pharmacol Biochem Behav.* 2004;78:83-91.
 28. Boston ME, Frech GC, Chacon-Cruze E, Buescher ES, Oelberg DG. Surfactant releases internal calcium stores in neutrophils by G protein-activated pathway. *Exp Bio Med (Maywood).* 2004;229(1):99-107.
 29. Shirota H, Goto M, Katayama K. Application of adjuvant-induced local hyperthermia for evaluation of anti-inflammatory drugs. *J Pharmacol Exp Ther.* 1988;247:1158-1163.
 30. Zeni S, Ingegoli E. [Raynauds phenomenon]. *Rheumatismo,* 2004;56:77-81.