

## مقاله پژوهشی

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان  
جلد چهارم، شماره دوم، بهار ۱۳۸۴

# اثر مسدهای کانال کلسیم بر روی آرتربیت تجربی ناشی از تزریق اجوانت کامل فروند در زانوی موش صحرایی

محمد رضا رحمانی<sup>\*</sup>، محمد خاکساری<sup>۱</sup>، مهدی محمودی<sup>۲</sup>، علی اصغر پورشانظری<sup>۳</sup>

دریافت: ۱۳۸۳/۱۲/۲۰ | پذیرش: ۱۳۸۴/۳/۱۰ | بازنگری: ۱۳۸۴/۳/۱۹

## خلاصه

سابقه و هدف: آرتربیت روماتویید یک بیماری التهابی مزمن مربوط به بافت همبند است که یک درصد جمعیت انسانی را مبتلا کرده است. از آن جایی که در مطالعات قبلی نقش آنتاگونیستهای کانال کلسیم در کاهش التهاب حاد نشان داده شده است، هدف مطالعه حاضر بررسی اثرات وراپامیل و نیوفدیپین بر روی آرتربیت تجربی ناشی از اجوانت کامل فروند (CFA) در زانوی موش صحرایی است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی برروی ۸ گروه موش صحرایی نر بالغ انجام شد. گروههای ۱ و ۲ گروههای CFA و کنترل بودند که به ترتیب در زانوی راست آنها ۰/۲ml CFA و سالین تزریق شد. گروههای ۳ و ۴ به ترتیب دوزهای ۱۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم نیوفدیپین و حیوانهای گروههای ۵ و ۶ نیز به ترتیب همین دوزهای وراپامیل را از روز هفتم بعد از تزریق CFA تا پایان مطالعه به صورت خوارکی دریافت کردند. گروه ۷ (گروه حلال) مشابه با گروههای ۵ و ۶ دی‌متیل‌سولفوكساید (DMSO) را به روش فوق مصرف کردند و حیوانهای گروه ۸، ایبوپروفن را به میزان ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت خوارکی دریافت کردند. تغییرات ناشی از التهاب مزمن از طریق اندازه‌گیری قطر زانو، محتوای رنگ آبی ایوانز (E.B) و تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت سینوویال زانو برای مدت ۲۸ روز بعد از تزریق CFA تعیین شد.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که در روز هفتم بعد از تزریق CFA، قطر زانو ( $13/1 \pm 0/2$  mm) در مقایسه با روز صفر ( $9/99 \pm 0/08$  mm) به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرده که این افزایش قطر تا پایان روز ۲۸ نیز دارای اختلاف معنی‌دار با روز صفر بود ( $p < 0/001$ ). همچنان DMSO نتوانست این افزایش قطر ناشی از تزریق CFA را مهار کند، در حالی که دوز زیاد نیوفدیپین در روزهای ۱۴ و ۲۱ و ۲۸ و دوز اندک آن فقط در روز ۲۸ به طور معنی‌داری افزایش قطر را کاهش داده است ( $p < 0/001$ ). دوز اندک وراپامیل در روزهای ۱۴ و ۲۸ و دوز زیاد آن فقط در روز ۲۱ اثر مهاری مشابهی اعمال نموده است. ایبوپروفن در همه روزهای مطالعه افزایش قطر را مهار نموده است ( $p < 0/01$ ). محتوای E.B قبل از تزریق CFA به میزان  $14 \mu\text{g}/100 \text{ mg tissue}$  بود، که بعد از تزریق به طور معنی‌داری افزایش یافت به طوری که در روز هفتم به میزان  $12/37 \pm 0/7$  میکروگرم به ازای ۱۰۰ میلی‌گرم بافت رسید ( $p < 0/001$ ). در همه روزهای مطالعه (۱۴، ۲۱ و ۲۸) هم دوزهای اندک و هم دوزهای زیاد مسدهای کانال کلسیم به طور معنی‌داری محتوای E.B را کاهش دادند ( $p < 0/001$ ) و اثرات مهاری آنها بر روی E.B خصوصاً در روز ۲۸ قابل مقایسه با اثر ایبوپروفن بود. همچنان دوزهای اندک و زیاد نیوفدیپین ارتضاح سلول‌های التهابی را در روزهای ۲۱ و ۲۸ کاسته در حالی که فقط دوز اندک وراپامیل این ویژگی را از خود نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر معرف این هستند که نیوفدیپین و وراپامیل در مهار آرتربیتیس تجربی زانو ناشی از تزریق CFA، از طریق کاهش قطر و کاهش محتوای E.B (نشت آلبومین) مؤثر می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: التهاب مزمن، وراپامیل، نیوفدیپین، اجوانت کامل فروند، آرتربیت تجربی

۱- مری و عضو هیأت علمی گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان (نویسنده مسئول)  
تلفن: ۰۳۹۱-۸۲۲۰۰۹۰، فاکس: ۰۳۹۱-۸۲۲۰۰۹۲، پست الکترونیکی: rahmanir47@yahoo.com

۲- دانشیار گروه فیزیولوژی و مرکر تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کرمان

۳- دانشیار گروه بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

۴- استادیار گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

**مقدمه**

التهابی، ترشح مواد شیمیایی از ماکروفازها و نوتروفیل‌ها [۱۰، ۳۰]، افزایش LTB<sub>4</sub> و نتیجتاً افزایش چسبندگی گلبول‌های سفید به اندوتیال عروق و افزایش مهاجرت آن‌ها به محل التهاب [۱۵، ۴۲] فعال شدن لنفوسيت‌ها [۱۹] نقش دارد. از سوی دیگر گزارش شده است که مسددهای کانال کلسیم باعث کاهش فشار هیدرولستاتیک در عروق [۴۲]، مهار تولید NO و آنزیم‌های سازنده ایکوزانوپیدها [۱۲، ۳۸]، کاهش رهایش هیستامین، برادی‌کینین، سروتونین، متابولیت‌های اسید آراشیدونیک، لوکوتربین‌ها [۱۸]، مهار مهاجرت لنفوسيت‌ها [۶]، مهار اثر IL-2 [۱۴]، ثبیت غشاء یاخته و کاهش جراحت به بافت می‌شوند.

از آن جایی که همه عوامل فوق در پیدایش تغییرات پاتولوژیک مشاهده شده در ایجاد التهاب، دخیل می‌باشند، این فرضیه مطرح می‌شود که شاید کلسیم در پیدایش تغییرات همراه با التهاب نقش داشته باشد و به همین لحاظ در مطالعات قبلی اثر مسددهای کانال‌های ولتاژی کلسیم در التهاب حاد بررسی و نقش مهاری آن‌ها در التهاب حاد نشان داده شد [۲۰، ۲۵]، بنابراین در مطالعه حاضر بررسی اثر مسددهای کانال کلسیم بر روی التهاب مزمن ناشی از تزریق اجوانت کامل فرونوند در زانوی موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفته و علاوه بر این اثرات آن‌ها با اثر ایبوپرو芬 (داروی ضد التهابی استاندارد) مقایسه می‌شود.

**مواد و روش‌ها**

۱- حیوان‌ها: این مطالعه مداخله‌ای - تجربی روی ۸۰ سر موش صحرایی بالغ نر از نژاد آلبینو انماری با وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم انجام گرفت. حیوان‌ها در حیوان‌خانه دانشکده پزشکی رفسنجان با درجه حرارت ۲۰-۲۲ درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی - روشنایی ۱۲ ساعته 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 فرونوند<sup>۱</sup> (CFA) با سرنگ انسولین به شماره ۲۶

آرتربیت روماتوپید بیماری التهابی مزمن بافت همبند است که یک بیماری سیستمیک نیز می‌باشد، این بیماری یک درصد جمعیت انسانی را مبتلا کرده است [۳۶]، که بسته به منطقه جغرافیایی تا حدودی متغیر است و شیوع آن در خانم‌ها ۳ تا ۴ برابر مردان است و در دهه‌های ۲ و ۳ زندگی شیوع بیشتری دارد [۱۷، ۳۷]. علی‌رغم مطالعات زیاد در چند سال اخیر، هنوز روش‌های درمانی جدید و مناسب و با تأثیر زیاد برای درمان آرتربیت روماتوپید در دسترس نمی‌باشد [۴۳].

تغییرات پاتولوژیک در آرتربیت روماتوپید با التهاب غشا سینوویال شروع می‌شود به طوری که یاخته‌های سینوویال و بافت‌های زیر سینوویوم چهار هیپرپلازی شده، گشاد شدن عروق و افزایش جریان خون باعث گرمی و قرمزی شده و نهایتاً سبب تشکیل خیز التهابی در اثر افزایش نفوذپذیری مویرگ‌ها و خروج مایع و پروتئین از گردش خون موضعی و تجمع گلبول‌های سفید چند هسته‌ای در جایگاه التهاب می‌شود [۴، ۲۲]. موارد فوق مسئول بروز علائم موضعی کلاسیک التهاب حاد بوده [۳۷] که در ادامه به التهاب مزمن تبدیل می‌شود. همچنین شاخص‌های زیر نیز برای التهاب مزمن مطرح شده‌اند: ۱- ارتضاح سلول‌های تک هسته‌ای شامل ماکروفازها و پلاسمـا سـلـهـا ۲- تخریب یافته‌ی به علت سلول‌های التهابی ۳- ترمیم از طریق جایگزینی بافت همبند و رگ‌سازی خصوصاً فیبروز [۱۳].

در حالت التهاب مزمن، همانند التهاب حاد، میانجی‌های شیمیایی مختلفی از قبیل: لوکوتربین‌ها، سیتوکین‌ها، کینین‌ها هیستامین، متابولیت‌های اسید آراشیدونیک، رادیکال‌های آزاد اکسیژن، اکسید نیتریک [NO] و ماده P نقش اساسی دارند [۱۲، ۲۹، ۳۸]. یون کلسیم در رهایش بسیاری از میانجی‌های التهابی فوق، فعال شدن آن‌ها و یا ایجاد اثرات آن‌ها نقش دارد، به طوری که گزارش شده است که کلسیم در فعال کردن فسفولیپاز A<sub>2</sub> و در نهایت افزایش محصولات مسیر متابولیسم اسید آراشیدونیک [۳۲]، فعال کردن PKC [۲۶]، تولید و ساخت NO [۳۳]، رهایش اینترلوکین‌ها [۴۲]، رهایش میانجی‌های از طریق تحریک روند اگروسویتوز، حرکت یاخته‌های

1- Complete Freund's Adjuvant

سپس با محلول EDTA (مرک، آلمان) دکلسفیفیه شدن بافت استخوان انجام، سپس در پارافین غوطه‌ور و برش‌های میکرونی با میکروتوم تهیه و با هماتوکسیلین و ائوزین (مرک، آلمان) رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری (زايس، آلمان) توسط یک نفر پاتولوژیست مورد بررسی قرار گرفت.

**۴- داروهای مصرفی:** اجوانات کامل فروند (بیوژن، مشهد)، وراپامیل و نیوفدیپین (اهدایی شرکت رز دارو، ایران) که با دوزهای ۱۰۰ و  $800\text{ }\mu\text{g/kg}$  و ایبوپروفن (سیگما، انگلستان) با دوز  $15\text{ mg/kg}$  به صورت خوارکی از طریق لوله دهانی معدی از روز هفتم بعد از تزریق CFA به حیوان‌ها داده شد. دوزهای استفاده شده در این مطالعه برای داروهای فوق در مطالعات قبلی اثر مهاری داشته‌اند [۲،۳]. داروهای مصرف شده در این مطالعه دردی متیل‌سولفوکسید (DMSO) (مرک، آلمان) حل شدند [۲]. حجم محلول‌های مصرفی  $1\text{ ml/kg}$  بود و محلول‌ها توسط فردی مشخص (که از تقسیم‌بندی گروه‌های آزمون مطلع نبود) و در ساعت معین از روز هفتم بعد از تزریق CFA (شروع التهاب مزمن) برای مدت ۲۱ روز به حیوان‌ها خورانده شدند. DMSO نیز به عنوان حلال به صورت هم حجم با داروهای فوق مصرف شد. رنگ آبی ایوانز جهت تعیین میزان نشت پروتئین از عروق (سیگما، انگلستان)، اورتان و اتر (مرک، آلمان) جهت ایجاد بی‌هوشی نیز استفاده شدند.

**۵- گروه‌های آزمایشی:** موش‌ها به روش تصادفی آسان به ۸ گروه زیر تقسیم شدند و در هر گروه ۱۰ سر حیوان وجود داشت:

**گروه ۱:** حیوان‌هایی که در اثر تزریق CFA دچار التهاب مزمن زانو شده‌اند و تغییرات قطر زانو، میزان E.B و تغییرات هیستوپاتولوژیک در آن‌ها برای روزهای ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ اندازه‌گیری شد. **گروه ۲:** در این گروه هم حجم CFA یعنی  $2\text{ ml}/20\text{ سرم}$  فیزیولوژیک (سالین) در زانوی راست آن‌ها تزریق شد و تغییرات مشابه با گروه ۱ در آن‌ها نیز بررسی شد. گروه‌های ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ نیز CFA در زانوی راست آن‌ها تزریق شد. **گروه ۳:** در این گروه وراپامیل با دوز  $100\text{ }\mu\text{g/kg}$  برای ۲۱ روز داده شد و موارد مشابه با گروه ۱ اندازه‌گیری شد. **گروه ۴:** در این گروه وراپامیل با دوز  $800\text{ }\mu\text{g/kg}$  برای ۲۱ روز داده شد و موارد مشابه با گروه ۱ اندازه‌گیری شد.

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 آرتربیت روماتویید در انسان ایجاد می‌کند [۲۸]. CFA ترکیبی از سوسپانسیون مایکروب‌کتریم توبرکلوزیس کشته و خشک شده در روغن معدنی می‌باشد [۱۶].

**۳- روش‌های اندازه‌گیری میزان التهاب در زانو:** با سه روش میزان التهاب در زانو مورد بررسی قرار گرفت:

**(الف) اندازه‌گیری تغییرات قطر مفصل:** اندازه‌گیری تغییرات قطر داخلی – جانبی مفصل زانو یکی از معیارها برای ارزیابی شدت التهاب می‌باشد [۲۸]، برای این کار از یک کولیس با دقت  $0.02\text{ mm}$  با دقت  $0.02\text{ mm}$  (Diamond، چین) استفاده شد. قطر مفصل زانوی راست در روز صفر (یا قبل از تزریق CFA) و روزهای ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ پس از تزریق در گروه‌های مختلف اندازه‌گیری شد. سپس تغییرات قبل و بعد از تزریق با یکدیگر مقایسه گردید [۱۱، ۱۶].

**(ب) اندازه‌گیری میزان خروج رنگ آبی ایوانز از عروق:** بعد از اقدامات فوق رنگ آبی ایوانز<sup>۱</sup> (E.B) به میزان  $20\text{ mg/kg}$  داخل ورید فمورال حیوان در روزهای صفر (یا قبل از تزریق CFA)، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ تزریق شد و نیم ساعت بعد حیوان کشته شده و بافت اطراف و کپسول مفصل جدا شده و با استفاده از روش خاص محتوای رنگ طبق فرمول بر حسب میکروگرم درصد میلی‌گرم بافت محاسبه و گزارش شد [۲]. با استفاده از این روش، پروتئین‌های پلاسمای خصوصاً آلبومین به این رنگ متصل شده، به طوری که وجود رنگ آبی در فضای بین سلولی (خارج عروق) نشان‌گر وجود پروتئین در خارج از عروق می‌باشد که در شرایط طبیعی در عروق محبوس می‌مانند، اما در شرایط التهاب مزمن نفوذپذیری عروق افزایش یافته و به موازات آن نشت پروتئین و تجمع رنگ در خارج از عروق رخ خواهد داد [۲].

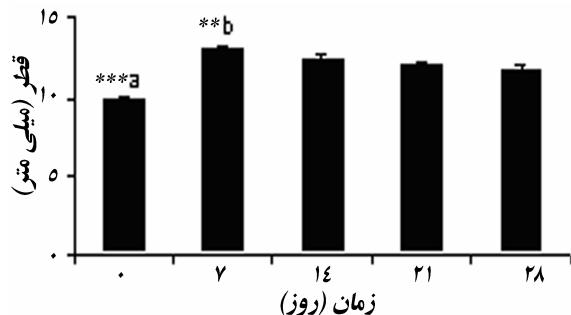
**(ج) آماده‌سازی مفصل زانو جهت مطالعات هیستوپاتولوژی:** بعد از کشتن حیوان‌ها (از هر گروه ۴ سر موش) با دوز بالای اورتان، مفصل زانوی راست همراه با استخوان متصل به آن قطع و در فرمالین برای مدت ۴۸ ساعت فیکس شده و

1- Evans Blue

التهابی و شدت التهاب را کاهش داده، به طوری که در روز ۲۸ مسئله خاص التهابی وجود نداشت. اگرچه وراپامیل با دوز زیاد نیز در روزهای ۱۴ و ۲۱ شدت التهاب را کاسته اما در روز ۲۸، افزایش سلولهای التهابی مشاهده شد. ایبوپرو芬 در روزهای مختلف مطالعه ارتasher ياختههای التهابی و شدت التهاب را کاهش داده است.

ب) نتایج حاصل از اندازه‌گیری قطر زانو:

اثر تزریق CFA بر روی افزایش قطر زانو در طی ۲۸ روز مطالعه در نمودار ۱ نشان داده شده است. در روز هفتم بعد از تزریق CFA قطر زانو ( $13/1 \pm 0/2$  mm) در مقایسه با روز صفر ( $9/99 \pm 0/08$  mm) افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد ( $p < 0/001$ ). افزایش قطر ناشی از تزریق CFA در روزهای بعد از روز ۷ کاهش یافته است، اگرچه هنوز اختلاف معنی‌دار بین روزهای ۱۴، ۲۱ و ۲۸ با روز صفر ( $p < 0/001$ ) و روز ۷ ( $p < 0/01$ ) وجود دارد.



نمودار ۱: میانگین قطر مفصل زانو (mm) در گروه دریافت کننده اجوانات کامل فرونند (CFA) با گروه ۱ در روزهای مختلف مطالعه. روز صفر، قطر زانو قبل از تزریق را نشان می‌دهد. a: اختلاف معنی‌دار بین گروه CFA در تمام ۲۸ روز نسبت به روز صفر. b: اختلاف معنی‌دار بین اندازه قطر مفصل در روز ۷ با روزهای ۱۴، ۲۱ و ۲۸ ( $p < 0/001$ ;  $p < 0/01$ ).

ج) نتایج حاصل از اثرات داروهای مختلف روی قطر زانو:

مقایسه اثرات داروهای مختلف بر روی افزایش قطر ناشی از تزریق CFA در جدول ۱ نشان داده شده است. اگرچه قطر مفصل زانو (mm) در روز صفر در گروههای CFA، سالین و DMSO (به ترتیب  $10/1 \pm 0/07$ ،  $9/99 \pm 0/08$  و  $10/0 \pm 0/08$  mm) یکسان است و اختلاف معنی‌دار بین آنها وجود ندارد، اما در روزهای ۱۴، ۷ و ۲۸ قطر زانو در گروه CFA بیشتر از گروه سالین است ( $p < 0/001$ ). از سوی دیگر، DMSO، افزایش قطر ناشی از CFA را مهار ننموده است، هم‌چنین اگرچه، قطر زانو

گروه ۵: در این گروه نیوفدیپین با دوز  $100\text{ }\mu\text{g/kg}$  برای ۲۱ روز داده شد و موارد مشابه با گروه ۱ در این حیوان‌ها بررسی شد.

گروه ۶: در این گروه نیوفدیپین با دوز  $80\text{ }\mu\text{g/kg}$  برای ۲۱ روز داده شد و موارد مشابه با گروه ۱ در این حیوان‌ها بررسی شد.

گروه ۷: در این گروه CFA تزریق شده و حلال داروها یعنی DMSO خورانده شد و تغییرات قطر زانو، میزان E.B و تغییرات هیستوپاتولوژیک مورد بررسی قرار گرفت. گروه ۸: در این گروه ایبوپرو芬 با دوز  $15\text{ mg/kg}$  برای ۲۱ روز داده شد و موارد گروه ۱ بررسی شد.

۶- روش آماری: نتایج به دست آمده توسط آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و به دنبال آن با استفاده از آزمون Tukey و در مواردی با آزمون t-test Student تجزیه و تحلیل شدند. داده‌های همه آزمایش‌ها به صورت Mean  $\pm$  SEM نشان داده شده و با شرط  $p < 0/05$  اختلاف معنی‌دار منظور گردید.

## نتایج

### الف) تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت سینوویال زانو:

گروهی که CFA به تنها یک دریافت کرده بود در روز هفتم التهاب شدید در مفصل و نسوج پیرامون آن به صورت ادم، پرخونی، اتساع عروق و ارتasher نوتروفیل‌ها مشاهده شد. در روز چهاردهم سلولهای لنفوцитی، پلاسماسیل‌ها و مونوسیت‌ها نیز مشاهده گردید. در روز ۲۱ رشته‌های فیبری ظاهر شده و هم چنین تکثیر غشای سینوویال رخ داده و در روز ۲۸ مطالعه افزایش رشته‌های فیبری، سلولهای گرانولوماتوز در حال تشکیل به همراه ژانت سل‌ها مشاهده شد. هم چنین از نظر هیستوپاتولوژی بین گروه CFA و DMSO اختلاف خاصی مشاهده نشد، از سوی دیگر در گروهی که سالین به جای CFA در زانوی آن‌ها تزریق شده بود سلولهای التهابی مشاهده نشدن.

گروهی که نیوفدیپین با دوز  $100\text{ }\mu\text{g/kg}$  دریافت نمودند، شدت التهاب در آن‌ها مختصراً کاسته شده و در روزهای ۲۱ و ۲۸ بر میزان سلولهای ژانت، گرانولوماتوز افزوده شده است و در مورد دوز  $80\text{ }\mu\text{g/kg}$  آن نیز در روزهای ۲۱ و ۲۸ ارتasher سلول‌ها کاسته شده و شدت ادم نیز کاهش یافته بود. دوز اندک وراپامیل از روز ۱۴ تا پایان مطالعه ارتasher سلولهای

است ( $p < 0.01$ ). در روز ۱۴ بین دوز اندک و راپامیل با دوز اندک نیفیدیپین ( $p < 0.01$ ) و دوزهای اندک و زیاد نیفیدیپین ( $p < 0.05$ ) و دوزهای اندک و زیاد و راپامیل ( $p < 0.01$ ) اختلاف معنی دار وجود دارد. در روز ۲۱ بین دوز اندک و زیاد نیفیدیپین نیز اختلاف معنی دار وجود دارد ( $p < 0.05$ ). در روز ۱۴ بین ایبوپروفن با دوز اندک نیفیدیپین ( $p < 0.01$ ) و دوزهای ۲۸ اختلاف معنی دار وجود دارد ( $p < 0.01$ ). در روز ۱۴ بین ایبوپروفن با دوز اندک و زیاد و راپامیل ( $p < 0.01$ ) اختلاف معنی دار وجود دارد، در حالی که در روز ۲۸ فقط بین ایبوپروفن و راپامیل ۸۰۰ اختلاف معنی دار وجود دارد ( $p < 0.01$ ).

در روز ۷ در گروههای مصرف کننده دوزهای اندک و زیاد مسددهای کانال کلسیم و در گروه ایبوپروفن یکسان است، اما در روز ۱۴ توسط دوز زیاد نیفیدیپین ( $p < 0.01$ ) و در روز ۲۱ توسط دوز اندک و زیاد و راپامیل و دوز زیاد نیفیدیپین ( $p < 0.01$ ) کاهش پیدا کرده است؛ علاوه بر این در روز ۲۸ هم دوزهای اندک و زیاد نیفیدیپین و هم دوز اندک و راپامیل افزایش قطر ناشی از تزریق CFA را مهار نموده، به طوری که اختلاف معنی دار بین این گروهها با گروه CFA و DMSO وجود دارد ( $p < 0.01$ ). ایبوپروفن در همه روزهای مطالعه به طور معنی داری افزایش قطر ناشی از CFA را کاهش داده

جدول ۱: مقایسه اثرات گروههای مختلف مطالعه بر روی قطر مفصل زانو (mm) در روزهای مختلف مطالعه

۲۸	۲۱	۱۴	۷	۰	روز گروه
$11/76 \pm 0.18^f$	$12/0.9 \pm 0.24^e$	$12/4 \pm 0.26$	$13/1 \pm 0.2^a$	$9/99 \pm 0.8$	CFA سالین
$9/74 \pm 0.07$	$9/7 \pm 0.06$	$9/71 \pm 0.06$	$9/81 \pm 0.08$	$10/1 \pm 0.07$	
$11/86 \pm 0.27$	$11/8 \pm 0.16$	$12/3 \pm 0.4$	$12/6 \pm 0.08^b$	$9/80 \pm 0.08$	
$10/68 \pm 0.2$	$11/12 \pm 0.29$	$11/91 \pm 0.14$	$13/4 \pm 0.22$	—	
$10/6 \pm 0.2$	$10/74 \pm 0.18$	$11/47 \pm 0.16^d$	$12/89 \pm 0.15$	—	
$10/65 \pm 0.18$	$10/0.7 \pm 0.24$	$11/0.2 \pm 0.11^c$	$12/8 \pm 0.2$	—	
$11/0.8 \pm 0.19$	$10/84 \pm 0.2$	$10/95 \pm 0.17$	$12/9 \pm 0.15$	—	
$9/9 \pm 0.14$	$10/87 \pm 0.32$	$10/46 \pm 0.27^g$	$13/2 \pm 0.25$	—	ایبوپروفن

داده ها به صورت  $Mean \pm SEM$  نمایش داده شده اند. CFA، اجوانت کامل فرونده، DMSO، دی متیل سولفوکساید، N-۱۰۰ و N-۸۰۰ به ترتیب دوزهای ۱۰۰ و ۸۰۰ میکرو گرم در کیلو گرم نیفیدیپین. V-۱۰۰ و V-۸۰۰، به ترتیب دوزهای ۱۰۰ و ۸۰۰ میکرو گرم در کیلو گرم و راپامیل. ایبوپروفن mg/kg. a: اختلاف معنی دار بین گروه سالین با CFA در همه روزهای مطالعه با  $p < 0.001$ . b: اختلاف معنی دار در روزهای ۲۱، ۱۴، ۷ و ۰ با روزهای مشابه در گروه سالین با  $p < 0.001$ . c: اختلاف معنی دار بین گروه CFA با دوز زیاد نیفیدیپین در روزهای ۲۱، ۱۴، ۷ و ۰ با  $p < 0.001$ . d: اختلاف معنی دار بین گروه CFA با دوز اندک و راپامیل در روز ۰ با  $p < 0.001$ . e: اختلاف معنی دار بین گروه CFA با دوز زیاد نیفیدیپین و دوزهای اندک و زیاد و راپامیل در روز ۰ با  $p < 0.001$ . f: اختلاف معنی دار بین گروه CFA با دوز اندک و زیاد نیفیدیپین و دوز اندک و راپامیل در روز ۰ با  $p < 0.001$ . g: اختلاف معنی دار بین ایبوپروفن با CFA در همه روزهای مطالعه با  $p < 0.001$ .

(D) نتایج حاصل از اندازه گیری مقدار رنگ آبی ایوانز: اثرات CFA و داروهای مختلف بر روی محتوای رنگ آبی ایوانز (E.B) در روزهای مختلف مطالعه در جدول ۲ نشان داده شده است. در روز صفر مطالعه میزان رنگ آبی ایوانز در گروههای CFA، سالین و DMSO یکسان بود

#### (D) نتایج حاصل از اندازه گیری مقدار رنگ آبی ایوانز:

اثرات CFA و داروهای مختلف بر روی محتوای رنگ آبی ایوانز (E.B) در روزهای مختلف مطالعه در جدول ۲ نشان داده شده است. در روز صفر مطالعه میزان رنگ آبی ایوانز در گروههای CFA، سالین و DMSO یکسان بود

مقایسه با CFA یا DMSO به طور معنی‌داری محتوای E.B را کاهش داده‌اند ( $p < 0.001$ ), که میزان در گروه‌های دوز اندک و زیاد نیفیدیپین محتوای E.B در روز ۲۸ (به ترتیب  $3/61 \pm 0.29$  و  $3/9 \pm 0.25$   $\mu\text{g}/100\text{mg}$  tissue) در گروه‌های  $3/5 \pm 0.32$  و  $4/08 \pm 0.48$  میکروگرم در صد میلی‌گرم مطالعه وجود داشت ( $p < 0.001$ ). یعنی اینکه مصرف DMSO به دوز اندک و زیاد و راپامیل در همین روز محتوای E.B به ترتیب  $3/5 \pm 0.32$  و  $4/08 \pm 0.48$  میکروگرم در صد میلی‌گرم بافت است؛ همچنین ایبوپروفن نیز در همه روزهای مطالعه محتوای E.B را در مقایسه با گروه‌های CFA و DMSO کاهش داد ( $p < 0.001$ ), به طوری که میزان E.B در روز ۲۸ در گروه ایبوپروفن  $2/61 \pm 0.29$   $\mu\text{g}/100\text{mg}$  tissue بود.

نتیجه‌ای مطالعه وجود داشت به طوری که در روز ۲۸ محتوای در گروه CFA ( $6/6 \pm 0.37$   $\mu\text{g}/100\text{mg}$  tissue) E.B گروه سالین ( $2/7 \pm 0.2$ ) بود ( $p < 0.001$ ). از سوی دیگر اختلاف معنی‌دار بین DMSO و گروه سالین در همه روزهای DMSO مطالعه وجود داشت ( $p < 0.001$ ), یعنی اینکه مصرف DMSO افزایش محتوای رنگ آبی ایوانز ناشی از تزریق CFA را مهار ننموده است. اگرچه در روز هفتم مطالعه اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مختلف مسددهای کانال کلسیم با گروه‌های CFA یا DMSO وجود ندارد، اما در روزهای ۲۱، ۱۴ و ۲۸ مطالعه هم دوزهای اندک و هم دوزهای زیاد و راپامیل یا نیفیدیپین در

جدول ۲: مقایسه اثرات گروه‌های مختلف مطالعه بر روی محتوای رنگ آبی ایوانز ( $\mu\text{g}/100\text{mg}$  tissue) در روزهای مختلف مطالعه

گروه	روز	*	۷	۱۴	۲۱	۲۸
CFA		$2/97 \pm 0.14^a$	$12/37 \pm 0.07$	$9/54 \pm 0.16^c$	$7/11 \pm 0.2^d$	$6/6 \pm 0.37^e$
سالین		$2/7 \pm 0.15$	$3/13 \pm 0.19^b$	$2/89 \pm 0.24$	$2/78 \pm 0.2$	$2/07 \pm 0.2$
DMSO		$2/7 \pm 0.25$	$12/2 \pm 0.05$	$8/2 \pm 0.25$	$6/73 \pm 0.76$	$6/75 \pm 0.68$
N - ۱۰۰		—	$12/7 \pm 0.03$	$6/45 \pm 0.35$	$5/42 \pm 0.2$	$3/9 \pm 0.25$
V - ۱۰۰		—	$12 \pm 0.04$	$6/93 \pm 0.26$	$5/46 \pm 0.04$	$4/08 \pm 0.47$
N - ۸۰۰		—	$11/5 \pm 0.02$	$4/08 \pm 0.19$	$3/16 \pm 0.43$	$2/61 \pm 0.29$
V - ۸۰۰		—	$12/7 \pm 0.05$	$3/81 \pm 0.76$	$3/32 \pm 0.13$	$3/5 \pm 0.32$
ایبوپروفن		—	$11/9 \pm 0.04$	$2/41 \pm 0.18^f$	$2/37 \pm 0.15$	$2/61 \pm 0.29$

دادهای به صورت  $Mean \pm SEM$  نمایش داده شده‌اند. CFA، اجوانات کامل فرونده، DMSO، دی‌متیل‌سولفوکساید،  $N-100$  و  $N-800$ ، به ترتیب دوزهای  $100$  و  $800$  میکروگرم در کیلوگرم نیفیدیپین.  $V-100$  و  $V-800$ ، به ترتیب دوزهای  $100$  و  $800$  میکروگرم در کیلوگرم و راپامیل. ایبوپروفن  $1.5 \text{ mg/kg}$ . a: اختلاف معنی‌دار در گروه CFA بین روز صفر با بقیه روزهای مطالعه با  $p < 0.001$ . b: اختلاف معنی‌دار بین گروه سالین با CFA و DMSO در روزهای  $21$ ،  $14$  و  $28$  با  $p < 0.001$ . c: اختلاف معنی‌دار بین گروه CFA با گروه دی‌متیل‌سولفوکساید و DMSO در روزهای  $21$ ،  $14$  و  $28$  با  $p < 0.001$ . d: اختلاف معنی‌دار بین گروه CFA با دوزهای اندک و زیاد و راپامیل و دوزهای اندک و زیاد نیفیدیپین در روز  $14$  با  $p < 0.001$ . e: اختلاف معنی‌دار بین گروه CFA با دوز اندک و زیاد و راپامیل و همچنین دوزهای اندک و زیاد نیفیدیپین در روز  $21$  با  $p < 0.001$ . f: اختلاف معنی‌دار بین ایبوپروفن با CFA و DMSO در روزهای  $21$ ،  $14$  و  $28$  مطالعه با  $p < 0.001$ .

(دوزهای  $100$  و  $800$  میکروگرم در کیلوگرم) در آرتیت تجربی (التهاب مزمن) در موش صحرایی مورد ارزیابی قرار گرفت.

## بحث

مطالعات قبلی تأثیر مسددهای کانال کلسیم را در التهاب حاد نشان داده‌اند [۲۰، ۲۵]، در مطالعه حاضر به منظور تعیین نقش کلسیم در التهاب مزمن، اثرات و راپامیل و نیفیدیپین

خصوص آلبومین به بیرون از عروق است؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که CFA نشت پروتئین عروقی را افزایش داده است. هم دوز انداز و هم دوز زیاد و راپامیل یا نیفیدیپین اثر مهاری معنی‌داری بر روی میزان رنگ آبی ایوانز خارج عروقی در روزهای ۲۱ و ۲۸ مطالعه داشتند، به طوری که در روز ۲۱ دوزهای زیاد و راپامیل و نیفیدیپین محتوای رنگ را به ترتیب به میزان ۵۳ و ۵۰ درصد کاهش دادند و در روز ۲۸، بیشترین اثر مهاری توسط دوز زیاد نیفیدیپین به میزان ۶۱ درصد اعمال شده است، که این اثر قابل مقایسه با اثر مهاری ایبوپروفن در همین روز است.

مشاهده اثر مهاری مسددهای کانال کلسیم بر روی قطر و محتوای E.B و تغیرات هیستوپاتولوژیک مفصل زانوی ملتهد، در مطالعه حاضر، بیان گر نقش واسطه‌ای کلسیم در ایجاد التهاب مزمن است. مکانیسم دقیق اثر مسددهای کانال کلسیم در کاهش التهاب مزمن مشخص نشده است اما داروهای فوق از طرور متعددی می‌توانند موجب بروز اثر فوق گردد که در اینجا به تعدادی از این مکانیسم‌ها اشاره می‌گردد: ۱- کاهش غلظت کلسیم در وریدها و در نتیجه کاهش فشار هیدرولاستاتیک در این عروق و مویرگ‌های خونی [۲]، ۲- مهار فعالیت پروتئین کیناز C (PKC) وابسته به کلسیم و در نتیجه مهار مسیرهای که توسط این آنزیم فعال می‌شوند [۲۶]، ۳- از طریق مهار PKC، افزایش NO را موجب شده و در نتیجه باعث شل شدن یاخته‌های اندوتلیوم عروق شده که منجر به بسته شدن شکاف بین یاخته‌های اندوتلیوم و کاهش نشت پروتئین می‌گردد، [۷،۳۸] ۴- مهار جریان رو به داخل کلسیم ناشی از بعضی از میانجی‌های در یاخته‌های اندوتلیوم عروق و شل شدن این یاخته‌ها [۲۹]، ۵- کاهش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و سوپراکسیدها [۳۹]، ۶- کاهش اثر التهاب‌زاوی پروستالاندین‌ها و سایر ایکوزانوئیدها [۵]، ۷- مهار رهایش میانجی‌های دخیل در التهاب از قبیل: هیستامین، برادی‌کینین، سروتونین و سایر میانجی‌ها [۴۰]، ۸- کاهش تولید لوکوتین‌ها (ترکیبات التهاب‌زاوی قوی) [۳۳]، ۹- افزایش رهایش CRH، کورتیزول و تقویت اثر آن‌ها، [۲۵] ۱۰- مهار تولید پپتیدهای مؤثر در عمل کمotaکسی نوتروفیل‌ها [۳۴]، ۱۱- مهار مهاجرت لنفوسیت‌های تحریک

نتایج این مطالعه نشان داد که تزریق داخل مفصلی CFA باعث افزایش معنی‌دار قطر زانو می‌شود که در روز سوم مطالعه به میزان حداقل می‌رسد و از روز هفتم حالت کفه پیدا می‌کند و از آنجایی که تقریباً این افزایش قطر تا روز ۲۸ (انتهای) مطالعه وجود داشت، نتیجه گیری می‌شود که اجوانت کامل فرونده، التهاب مزمن ایجاد کرده است، که تأییدی بر مطالعات قبلی است [۲۳]. همچنین با مطالعه مکدوگال و همکاران که اعلام نموده‌اند که بعد از تزریق داخل مفصلی CFA التهاب مزمن در روز هفتم در مفصل ایجاد می‌شود، همانگ است [۲۷]؛ اگرچه با مطالعات دیگران که بیان نموده‌اند، التهاب مزمن از روز چهارم بعد از تزریق CFA ایجاد می‌شود، هم‌خوانی ندارد [۱،۲۰]. CFA احتمالاً از طریق افزایش تولید پروستاگلاندین‌ها، کاهش گروههای سولفیدریل (SH) سرم، افزایش تولید گلوتاتیون خون (GSH) [۱۶]، تجمع فاگوسیت‌ها در مفاصل و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و سوپراکسیدها [۱۶] التهاب مزمن یا آرتیریت مفصلی را ایجاد نموده است.

صرف هر دو مهار کننده کانال کلسیم در حیوان‌های با التهاب مزمن، قطر مفصل زانو را کاهش داد، به طوری که بیشترین اثر مهاری دوز انداز و راپامیل در روز ۲۱ به میزان ۱۱/۲ درصد و دوز زیاد آن در روزهای ۱۴ و ۲۱ به ترتیب به میزان‌های ۱۱/۳۸ و ۱۰/۴۱ درصد بر روی افزایش قطر ناشی از CFA مشاهده شد. هم‌چنین دوز انداز نیفیدیپین در روز ۲۸ به میزان ۸/۷ درصد و دوز زیاد نیفیدیپین در روز ۲۱ به میزان ۱۱/۶ درصد نسبت به روز صفر، افزایش قطر زانو را مهار نمود. اثر مهاری دوز زیاد این مسددها بر روی قطر زانو خصوصاً در روز ۲۱ مطالعه قابل مقایسه با اثر ایبوپروفن است، اگرچه اثر مهاری ایبوپروفن در روز ۲۸ بیشتر از اثر مهاری هر دو دوز و راپامیل و نیفیدیپین است. از سوی دیگر نتایج این مطالعه معروف این هست که، حدود ۴۰۰ درصد محتوای رنگ آبی ایوانز خارج عروقی مفصل زانو در روز هفتم توسط CFA در مقایسه با روز صفر افزایش یافته، اگرچه این افزایش تا روز ۲۸ وجود داشت، اما مقدار آن کمتر شده بود، به طوری که در این روز حدود ۲۰۰ درصد می‌رسید. از آنجایی که میزان خروج این ماده رنگی نشانه‌ای از نشت پروتئین‌های پلاسمای به

معنی دار وجود دارد. تفاوت بین اثرات وراپامیل و نیفیدیپین بر روی کاهش قطر زانو می‌تواند به علت تفاوت ساختمانی این دو آنتاگونوست باشد، زیرا این تفاوت می‌تواند بعضی از تفاوت‌ها را در عملکرد آن‌ها به وجود آورد، به طوری که گزارش شده است که وراپامیل دارای اثر قلبی کمتر و اثر عروقی بیشتر است [۴۴].

در مجموع، بررسی حاضر نشان داد که هم وراپامیل و هم نیفیدیپین دارای اثر قوی و قابل ملاحظه‌ای بر ضد تورم مفصل زانو و همچنان افزایش نفوذپذیری عروق و تغییرات هیستوتولوژیک مفصل با التهاب مزمن می‌باشد؛ بنابراین دارای اثرات بالقوه بر روی عملکرد سیستم‌های دخیل در پاتوژن آرتربیت روماتوید می‌باشند. با این وجود، اگر اهمیت یون کلسیم در فرآیندهای دخیل در ایجاد آرتربیتیس مورد قبول واقع شود، ما می‌توانیم امیدوار باشیم که نسل جدیدی از داروهای مؤثر برای این اختلال مزمن معرفی شوند. البته برای صحت این ادعا پیشنهاد می‌شود که اولاً مکانیسم‌های دخیل در اثرات ضد التهابی این مسدها توسط پژوهش‌های بیشتر مشخص شده و ثانیاً کارآزمایی بالینی انجام شود.

## تشکر و قدردانی

این پژوهش به عنوان طرح تحقیقاتی از سوی شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان تصویب شده و از حمایت مالی این دانشگاه برخوردار بوده است، لذا بدبین و سیله از مسئولان ذی‌ربط قدردانی به عمل می‌آید. همچنان نویسنده‌گان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از خدمات آقای دکتر امیر رهنما و آقای مهدی شریعتی قدردانی نمایند.

شده توسط IL-1 و IL-8 [۶] که با نتایج هیستولوژیک مطالعه حاضر هم خوانی دارد، ۱۲- کاهش نفوذپذیری عروق در اثر LTB<sub>4</sub> [۳۵]، ۱۳- کاهش سیالیت و نفوذپذیری غشا از طریق مهار PLA<sub>2</sub> [۱۵]، ۱۴- کاهش رهایش و همچنین کاهش بیان ژن TNF- $\alpha$  و به دنبال آن کاهش التهاب [۱۱، ۳۱]، کاهش ورود کلسیم به نوتروفیل‌ها [۹]، کاهش عملکرد VEGF (فاکتور رشد اندوتیال عروق یا فاکتور نفوذپذیری عروق) و نتیجتاً اصلاح عملکرد عروق [۴۱]. اثر مفید آنتاگونوست‌های کلسیم بر روی مهار آرتربیت تجربی [التهاب مزمن] با گزارش‌هایی که در مورد اثر مفید این داروها بر کاهش التهاب حاد ناشی از کاراگینین [۲۰، ۲۵]، کاهش پانکراتیت حاد [۲]، کاهش التهاب ریه [۲۴]، کاهش آرتروواسکلروزیس از طریق کاهش التهاب [۱۱]، کاهش نفوذپذیری عروق در دیابت قندی [۳]، کاهش خیز مغزی [۴۵]، و کاهش نشت پروتئین از عروق مغزی [۸] مطابقت دارد، اگرچه یک مورد گزارش نیز وجود دارد که این داروهای مسدود کانال کلسیم، محتوای رنگ آبی ایوانز (افزايش نفوذپذیری به آلبومین) را در کلیه‌های موش صحرایی تحت درمان با این داروها افزایش می‌دهند [۲۱].

نتایج بخش دیگر این پژوهش نشان می‌دهد که در روز ۱۴ مطالعه هر دو مسدود کانال کلسیم به صورت وابسته به دوز بر روی کاهش قطر مفصل زانو عمل نموده‌اند، اما در روز ۲۱ فقط نیفیدیپین دارای اثر وابسته به دوز است، از سوی دیگر به نظر می‌رسد که اثر دوز زیاد وراپامیل با گذشت زمان کاهش پیدا کرده است، به طوری که در روز ۲۸ اولاً اثر دوز زیاد کمتر از دوز اندک بوده و ثانیاً بین ایسوپروفن و دوز زیاد اختلاف

## منابع

- [۱] بدوى م و همکاران: کاهش پاسخ‌دهی عروق زانو موش صحرایی به تحریک گیرنده‌های آلفا‌ادرنرژیک در شرایط التهاب مزمن: نقش نیتریک اکساید. مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی، ۱۳۷۹، ۴(۲)، صفحات: ۱۷۵-۸۶.
- [۲] خاکساری م، سجادی م: اثرات وراپامیل و نیفیدیپین بر التهاب ناشی از کاراگینین در پنجه موش‌های صحرایی. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان. ۱۳۷۸، جلد ۶ شماره ۴، صفحات: ۱۹۱-۸.
- [۳] محمودی م، خاکساری م، اسدی کرم غر، بهادران م: اثر نیفیدیپین و وراپامیل بر نارسایی عروقی دیابت مزمن تجربی در موش صحرایی. مجله کومش ۱۳۸۳، جلد ۵ شماره ۳ و ۴، صفحات: ۱۴۳-۵۰.

- [4] Alexander F, Mathison M, Teoh KH, et al: Arachidonic acid metabolites mediate early burn edema. *J Trauma.*, 1984; 24(8): 709-12.
- [5] Andrew C, Nicholson O, Etingin P: Dihydropyridine calcium antagonist modulates cholesterol metabolism and eicosanoid biosynthesis in cells journal of cellular biochemistry 1992; 48: 393-400.
- [6] Bacon KB, Westwick J, Camp RD: Potent and specific inhibition of IL-8-, IL-1alpha- and IL-1beta- induced in vitro human lymphocyte migration by calcium channel antagonists. *Biochem Biophys Res Commun.*, 1989; 165(1): 349-54.
- [7] Beckman JA, Golfime AB, Gordon MB. Inhibition of protein kinase C beta prevents impaired endothelium-dependent vasodilation caused by hyperglycemia in humans. *Circ Res.*, 2002; 90(1): 107-11.
- [8] Blezer E, Nicolay K, Goldschmeding R, Koomans HA, Joles J: Reduction of cerebral injury in stroke-prone spontaneously hypertensive rats by amlodipine. *EUR J Pharmacol.*, 2002; 444(1-2): 75-81.
- [9] Boston ME, Frech GC, Chacon-Cruze E, Buesher ES, Oelberg DG: Surfactant releases internal calcium stores in neutrophils by G protein-activated pathway. *Exp Biol Med (Maywood).*, 2004; 229(1): 99-107.
- [10] Broecke RT, Leusink-Muis T, Hiberdink R, et al: Specific modulation of calmodulin activity induces a dramatic production of superoxide by alveolar macrophages. *Lab Invest.*, 2004; 84(1): 29-40.
- [11] Brown DM, Donaldson K, Borm PJ, Schins RP, Dchnhardt M, et al: Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF-alpha cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles. *AM J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, 2004; 286(2): L344-53.
- [12] Chang J, Blaze KE, Carlson RP: Inhibition of phospholipase A2 (PLA2) activity by nifedipine and nisoldipine is independent of their calcium – channel blocking activity. *Inflammation*, 1987; 11(3): 353-64.
- [13] Collins T: Acute and chronic inflammation.In Robbins pathologic basis of disease edited by R.S.Cotran, V.Kumar.And T.Collins. (6th ed) Philadelphia, Pennsylvania: W.B.Saunders company, 1999; chapt (3), pp: 50-88.
- [14] Birx DL, Berger M, Fleisher TA: The interference of T cell activation by calcium channel blocking agents. *J Immunol.*, 1984; 133(6): 2904-9.
- [15] Dugal D, Scott T: Acute joint inflammation-mechanisms and mediators. *Gen pharmacol.*, 1994; 25(7): 1285-96.
- [16] Fahim AT, Abd-el Fattah AA, et al: Effect of pumpkin-seed oil on the level of free radical scavenger in induced during adjuvant-arthritis in rats. *Pharmacol Res.*, 1995; 31(1): 73-9.
- [17] Fauci AS, Braunwald E: Harrison's Principle of internal medicine, 15th ed. New York: MC Graw Hill Companies 2001; vol.2, pp: 1928-37.
- [18] Fedorak RN, Empey LR, Walker K: Verapamil alters eicosanoid synthesis and accelerates healing during experimental colitis in rats. *Gastroenterology*, 1992; 102(4pt1): 1229-35.
- [19] Greene WC, Parker CM, Parker CW: Calcium lymphocyte activation. *Cell Immunol.*, 1976; 25(1): 74-89.
- [20] Hiroshi S, Masaki G, kouichi K: Application of Adjuvant – in inflammatory drugs induced local hyperthermia for evaluation of Anti – inflammatory Drugs. *J Pharma and Exp .therapeutics.*, 1988; 247(3): 1158-63.
- [21] Hulthen UL, Cao Z, Rumble JR, Cooper ME, Johnston CI: Vascular hypertrophy and albumin permeability in a rat model combining hypertension and diabetes mellitus. Effects of calcium antagonism, angiotensin converting enzyme inhibition, and angiotensinII-AT1-receptor blockade. *AM J Hypertens.*, 1996; 9(9): 895-901.

- [22] Hurley JV, Staub NC, Taylor AE: Textbook of edema. New York Raven pres 1984; pp: 463-88.
- [23] Karimian SM, Mcpougall JJ, Ferrell WR: Neuropeptidergic and autonomic control of the vasculature of the rat knee joint revealed by laser Doppler perfusion imaging. *Exp physiol* 1995; 80(3): 341-8.
- [24] Kataoka C, Egashira K, Ishibashi M, Inoue S, Ni W, et al: Novel anti-inflammatory actions of amlodipine in a rat model of arteriosclerosis induced by long-term inhibition of nitric oxide synthesis. *AM J Physiol Heart Circ Physiol.*, 2004; 286(2): H768-74.
- [25] Khaksari M, Mahani SE, Mahmoodi M: Calcium channel blockers reduce inflammatory edema in rat: involvement of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Indian J Pharmacol.*, 2004; 36(6): 351-54.
- [26] Koya D, King GL: Protein kinase C activation and development of diabetic complications. *Diabetes*, 1998; 47(6): 859-66.
- [27] McDougall JJ: Abrogation of alpha-adrenergic vasoactivity in chronically inflamed rat knee joints. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 2001; 281(3):R821-7.
- [28] McDougall JJ, karimian S.M, Ferrell WR: Prolonged alteration of vasoconstrictor and vasodilator responses in rat knee joints by adjuvant monoarthritis. *EXP Physiol.*, 1995; 80(3): 344-57.
- [29] Mendelowitz D, Bacal K, Kunze DL: Bradykinin-activated calcium influx pathway in bovine aortic endothelial cells. *Am J Physiol.*, 1992; 262(4Pt2): H942-8.
- [30] Middleton EJr: Calcium antagonists and asthma. *J Allergy Clin Immunol.*, 1985; 76(2Pt2): 341-6.
- [31] Mott RT, Ait-Ghezala G, Town T, Mori T, Vendrame M, et al: Neuronal expression of CD22: novel mechanism for inhibiting microglial proinflammatory cytokine production. *Glia*, 2004; 46(4):369-79.
- [32] Ogle CW, Cho CH, Tong MC, Koo MW: The influence of verapamil on the gastric effects of stress in rats. *Eur J Pharmacol.*, 1985; 112(3): 399-404.
- [33] Rodler S, Roth M, Nauck M, Tamm M, Block LH: Ca (2+)-channel blockers modulate the expression of interleukin-6 and interleukin-8 genes in human vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol.*, 1995; 27(10): 2295-302.
- [34] Rosales C, Brown EJ: Calcium channel blockers nifedipine and diltiazem inhibit Ca<sup>2+</sup>release from intracellular stores in neutrophils. *J Biochem.*, 1992; 267(3): 1443-8.
- [35] Rosen B: Influence of calcium on the invivo flow of leukocytes and erythrocytes. *Prog Appl Microcirc.*, 1989; pp: 67-87.
- [36] Ruddy S, Harris ED, Sledge CB: Kelley's text book of rheumatology, Philadelphia: W.B. Saunders 2001; vol.1, pp: 401-16.
- [37] Scott DT, Lam FY: Acute Inflammation enhances substance – induced plasma protein extravasations in the rat knee joint. *Regul Pept.*, 1992; 39(2-3): 227-35.
- [38] Shamimunisa B: Effects of calcium chnnel antagonists on LPS – induced hepatic iNOS expression. *AM J physiol.*, 1999; 40: G351-G60.
- [39] Sobal G, Menzel EJ, Sinzinger H: Calcium antagonistsas as inhibitors of in vitro low density lipoprotein oxidation and glycation. *Biochem Pharmacol.*, 2001; 61(3): 373-9.
- [40] southan G, Szabo C: Selective Pharmacological inhibition of distinct oxide synthesis informs. *Biochem pharmacol.*, 1995; 51(4): 383-94.
- [41] Tilton RG, Kawamura T, Chang KC, et al: Vascular dysfunction induced by elevated glucose levels in rats is mediated by vascular endothelial growth factor. *J Clin Invest.*, 1997; 99(2): 2192-202.
- [42] Warren JB: Vascular control of inflammatory edema. *Clin Sci (Lond).*, 1993;84(6): 581-4.
- [43] William P, Arend Jean-michl D: Inhibition of the production and efeects of interlukin-1 and

- tumor necrosis factor  $\alpha$  in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 1995; 38(2):151-60.
- [44] Wirth KJ, Alpermann HG, Satoh R, Inazu M: The bradykinin antagonist Hoe 140 inhibits carrageenan-and thermically induced paw edema in rats. *Agents Actions Suppl.*, 1992; 38(Pt3): 428-31.
- [45] Yang SY, Wang ZG: Therapeutic effect of nimodipine on experimental brain injury. *Chin J Traumatol.*, 2003; 6(6): 326-31.

# The Effect of Calcium Channel Blockers on Experimental Arthritis Induced by Complete Ferund's Adjuvant Injection in Rat Knee

**MR. Rahmani MSc<sup>1\*</sup>, M. Khaksahri PhD<sup>2</sup>, M. Mahmoodi PhD<sup>3</sup>, AA. Pourshanazari PhD<sup>4</sup>**

**1- Academic Member, Dept. of Physiology and Pharmacology, University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran**

**2- Associated Professor, Dept. of Physiology and Phisiology Research Center, University of Medical Sciences, Kerman, Iran**

**3- Associated Professor, Dept. of Biochemistry and Biophysic, University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran**

**4- Assistant Professor, Dept. of Physiology and Pharmacology, University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran**

**Background:** Rheumatoid arthritis is a chronic inflammatory disorder of connective tissue that has affected 1% of human population. The role of calcium antagonists in acute inflammation has shown by previous studies. Therefore the aim of the present study was to investigate the effect of verapamil and nifedipine (two calcium antagonists) on experimental arthritis induced by complete Ferund's adjuvant (CFA) in rat knee.

**Materials and Methods:** This experimental study was carried out in 8 groups of adult male rats. In group 1 and 2 (CFA and control group), 0.2 ml of CFA or saline solution were injected respectively. Groups 3and 4 received 100 and 800 $\mu$ g/kg nifedipine and groups 5 and 6 received the same doses of verapamil orally 7 days after injection of CFA till the end of study. Group 7 (solvent group) received dimethyl sulfoxide (DMSO) as same as groups 5 and 6 and group 8 received 15mg/kg ibuprofen daily from day 7th orally with gastrointestinal tube. The changes caused by chronic inflammation were evaluated by measurement the knee diameter and Evans blue (E.B) content through 28 through days of CFA injection.

**Results:** The finding of this study showed that on day 7th after CFA injection the knee diameter ( $13.1\pm0.2$ mm) increased significantly compared to the day zero ( $9.99\pm0.08$  mm). The increasing of diameter was significant till the end of study (day 28) ( $p<0.001$ ). DMSO failed to reduce the increased diameter induced by CFA but the high dose of nifedipine on day 14, 21 and 28 and its low dose only on day 28 reduced the increased diameter significantly ( $p<0.01$ ). The low dose of verapamil on days 14 and 28 and its high dose only on day 28 have had an inhibitory effect. Ibuprofen inhibited the increased diameter during all 28 days of study significantly ( $p<0.01$ ). The E.B content before the injection of CFA was  $2.97\pm0.14$   $\mu$ g/100mg tissue that increased significantly after injection of CFA. Whereas 7 days after CFA injection, E.B content was  $12.37\pm0.7$   $\mu$ g/100mg tissue ( $p<0.001$ ). Either low or high dose of calcium channel blockers had significant inhibitory effect on E.B content on days 14, 21 and 28  $p<0.001$ . The inhibitory effect of calcium channel blockers on E.B content was comparable to ibuprofen effect on the day 28.

**Conclusion:** The findings of this study showed that nifedipine and verapamil can inhibit the experimental arthritis induced by CFA injection into the rat knee, by reducing the knee diameter and decrease the E.B content (albumin leakage).

**Key words:** Chronic inflammation, Verapamil, Nifedipine, CFA, Experimental arthritis

**\*Corresponding author, Tel:(0391)8220090,Fax:(0391)8220092, E-mail: rahmanir47@yahoo.com**

**Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences and Health Services, 2005, 4(2): 73-84**