

اثر تزریق داخل صفاقی و موضعی ویتامین B6 بر پاسخ درد ناشی از فرمالین در موش سوری

میرهادی خیاط نوری*

۱- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز - ایران.

* نویسنده مسئول: khayat_nouri@yahoo.com

Effect of intraperitoneal and local injection of vitamin B6 on pain response induced by formalin in mice

Khayat Nouri, M.H.^{1*}

¹Department of Phathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Tabriz-Iran

Abstract

The B-vitamin, pyridoxine (vitamin B6) importance in nutrition, axonal transport, excitability of neurons, or synthesis of neurotransmitters. A number of studies have shown that vitamin B6 has antinociception and antiinflammatory effects in a range of animal models (but not all animals). The aim of this study was to investigate the effect of intraperitoneal and local injection of vitamin B6 on formalin-induced pain and inflammatory in mice. In this experimental study, vitamin B6 (50mg/kg) was intraperitoneally injected 15 minutes and with 5% concentration (20μl) was intrapawley injected 5 minutes before intrapawley formalin (20μl, 5%) injection. The time of licking and biting of injected paw was measured as pain response at 5 minutes intervals for 1 hour. The results showed that formalin-induced a biphasic pain response ($p < 0.05$) (first phase: 0-5 and second phase: 15-45 minute after injection). Intraperitoneally and local injection of vitamin B6 before formalin only reduced the second phase (inflammatory pain) of pain response significantly ($p < 0.05$). Our results suggested that the vitamin B6 possess antinociceptive activity probably via a decrease on the release of neurotransmitters and other substances that promote nociception and inflammation. *Vet.J.of Islamic. Azad.Univ., Garmsar Branch. 4,2:59-67,2008.*

Key words: Vitamin B6, Pain, Formalin, Mice.

چکیده

ویتامین B6 نقش مهمی در تغذیه، انتقال آکسونی، تحریک پذیری نورون‌ها و سنتز نوروترانسمیترها دارد. چندین مطالعات نشان داده‌اند که ویتامین B6 اثرات ضد دردی و ضد التهابی در مدل‌های مختلف حیوانی دارد (اما در همه مدل‌ها این اثرات نشان داده نشده است). هدف از این مطالعه تعیین اثر تزریق داخل صفاقی و موضعی ویتامین B6 بر رفتار درد و التهاب ناشی از فرمالین در موش سوری می‌باشد. در این مطالعه تجربی، ویتامین B6 با دوز 50 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی 15 دقیقه، و با غلظت 5 درصد با حجم 20 میکرولیتر به صورت موضعی در کف پا، 5 دقیقه قبل از تزریق کف پای فرمالین 5 درصد با حجم 20 میکرولیتر تزریق ($p < 0.05$) شد. مدت زمان لیسیدن و گاز گرفتن پنجه پای تزریق شده به عنوان پاسخ درد در فواصل زمانی 5 دقیقه‌ای به مدت یک ساعت ثبت شد. نتایج نشان داد که تزریق کف پای فرمالین یک رفتار درد دو مرحله‌ای ($p < 0.05$) (مرحله اول: 0-5 و مرحله دوم: 15-45 دقیقه پس از تزریق) ایجاد می‌کند. تزریق داخل صفاقی و موضعی ویتامین B6 قبل از فرمالین، فقط پاسخ درد مرحله دوم (درد التهابی) را به طور معنی‌دار ($p < 0.05$) کاهش داد. بر اساس نتایج چنین می‌توان پیشنهاد کرد که ویتامین B6 اثر کاهش دهنده درد و التهاب ایجاد می‌کند. این اثر احتمالاً بدلیل کاهش آزاد سازی نوروترانسمیترها و دیگر واسطه‌های درد و التهاب است. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، 1387، دوره 4، شماره 2، 67-59.

واژه‌های کلیدی: ویتامین B6، درد، فرمالین، موش سوری.

مقدمه

ویتامین‌های گروه B، از جمله پیریدوکسین (ویتامین B6) برای تغذیه، انتقال آکسونی، تحریک پذیری نورونی و سنتز نوروترانسمیترها مهم و ضروری هستند (27، 11). کمبود ویتامین‌های B بخصوص ویتامین B1، B2، B6 و B12 ممکن است در حالات پاتولوژیک مختلف از جمله صرع، سندرم tunnel carpal، اختلالات نوروپاتیک، میگرن، افسردگی و درد مزمن

نقش داشته باشد (16، 11، 8). اخیراً به ویتامین‌های گروه B به خصوص ویتامین B6 به عنوان فاکتور ضد درد و ضد التهاب توجه شده است و در همین رابطه مطرح کرده‌اند که ویتامین B6 در مدل‌های پیش درمانگاهی و درمانگاهی درد، اثر ضد درد و ضد التهاب ایجاد کرده است (27). از ویتامین‌های گروه B در کلینیک برای درمان بعضی از حالات همراه درد مثل درد کمر، درد عصب سیاتیک، دردهای مزمن ناشی از نوروپاتی دیابتی، پلی‌نورپاتی ناشی از الکل و آرتریت روماتوئید استفاده کرده‌اند (27، 18).



تشنج، میگرن و اختلالات عصبی در ارتباط است (۱۶). همچنین میزان کمبود ویتامین B6 با نوع و شدت بیماری ایجاد شده مثل آرتریت روماتوئید متناسب است (۵). Bates و همکاران نشان دادند که در جمعیت‌هایی که دچار حالات التهابی فاز حاد هستند، میزان ویتامین B6 در حداقل مقدار خود است و کمبود ویتامین B6 باعث افزایش چندین شاخص التهاب و ریسک فاکتور ترومبوزیس می‌شود (۵، ۱۱، ۱۲). چندین مطالعه کلینیکی و اپیدمیولوژیکی ارتباط بین کمبود ویتامین B6 و بیماری‌های التهابی را نشان داده است. در مطالعه کلینیکی گزارش کردند که میزان ویتامین B6 در بیماران بعد از جراحی و ضربه کاهش می‌یابد (۵). همچنین در بیماری التهابی روده در افرادی که شکل فعال بیماری را داشتند میزان پلاسمایی ویتامین B6 در حداقل میزان خود است (۲۴). در مطالعه مشابه دیگری نشان داده‌اند که میزان پلاسمایی پیریدوکسال ۵- فسفات در ارتباط نزدیک با التهاب در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید، شدت درد، میزان فاکتور نکروز دهنده تومور نوع آلفا، پروتئین C-reactive و سایر شاخص‌های التهابی، میزان آلومین سرم و میزان سدیمان‌تاسیون گلبول‌های قرمز می‌باشد (۴). در بررسی دیگری تجویز مقدار کم ویتامین B6 در گردش خون توانست میزان شاخص‌های التهابی از جمله پروتئین C-reactive را کاهش دهد (۱۲).

این مطالعات نقش مهمی در سلامت اجتماعی داشته و پیشنهاد می‌کنند که ویتامین‌های گروه B می‌توانند اثرات ضد دردی و ضد التهابی داشته باشند. از طرف دیگر بیشتر مطالعات توسط محققان در مدل‌های صفحه داغ، تحریک الکتریکی، درد نوروپاتی و مدل اسیداستیک انجام شده است (۲۲، ۲۳، ۲۴، ۱۱، ۳). اما در همه مدل‌های درد و التهاب این اثرات را نشان نداده‌اند، بخصوص در مورد ویتامین B6 که اطلاعات کمی در دست بوده و هیچ تحقیقی در مورد اثر موضعی و محیطی این ماده بر روی درد در داخل و خارج از کشور وجود ندارد. با توجه به اینکه ویتامین B6 یکی از اجزاء ضروری برای بدن پستانداران است، بررسی این موضوع که آیا این ویتامین می‌تواند اثر ضد دردی و ضد التهابی داشته باشد، ضروری به نظر می‌رسد.

مواد و روش کار

در این مطالعه تجربی، از تعداد ۸۰ سر موش سوری نر استفاده شد. موش‌های سوری نر نژاد NMRI، با وزن بین ۳۰-۲۵ گرم، از مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی خریداری شده و در قفس‌های

همچنین مشخص شده است که ویتامین‌های گروه B، در پیشگیری از دردهای میگرن موثر بوده و افزایش اثر ضد دردی با داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی نشان داده شده است (۱۱). اثرات ضد دردی و ضد التهابی ویتامین‌های B1، B6 و B12 را در آزمایشات تجربی بر روی حیوانات آزمایشگاهی در مدل‌هایی مثل درد حاد ناشی از تحریک الکتریکی، شیمیایی و حرارت نشان داده‌اند (۲۷). به طوری که در یک مطالعه، کمبود ویتامین B6 میزان ادم پنجه پا را در مدل التهابی موش صحرایی تا ۵۴ درصد افزایش داد (۵). در مطالعه دیگری ویتامین B6 توانست درد ناشی از صفحه داغ و درد شکمی القاء شده توسط بنزوکونینون را در موش‌های سوری و صحرایی کاهش دهد (۱۱). در مدل دیگری اثرات ضد التهابی و ضد دردی داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی (NSAID) توسط ویتامین B6 در مدل التهابی کارائین افزایش یافت (۱۱).

مشخص شده است که کمبود ویتامین B6 ممکن است باعث بروز و توسعه نوروپاتی محیطی شود. به طوری که در مدل تجربی آزمایشگاهی بر روی موش صحرایی، کمبود ویتامین B6 باعث بروز نوروپاتی می‌شود و دانسیته فیبرهای عصبی کاهش یافته و نسبت آکسون به میلین افزایش می‌یابد که نشان دهنده نوروپاتی محیطی می‌باشد و تجویز ویتامین B6 در این حیوانات می‌تواند از نوروپاتی تجربی پیشگیری کند (۱۴). در مطالعه دیگری نشان داده‌اند که تجویز پیریدوکسین می‌تواند نوروپاتی ناشی از دیابت را کاهش دهد (۱۴). در مطالعه این ویترو برای نشان دادن مکانیسم محافظتی پیریدوکسین و متابولیت واسط پیریدوکسامین بر روی نوروپاتی محیطی ناشی از دیابت، مشخص شد که ویتامین B6 باعث مهار رادیکال‌های آزاد، پراکسیداسیون لیپیدها، گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها و باعث تقویت عملکرد پمپ $(Na^+/K^+)-ATPase$ می‌شود (۱۵).

بر خلاف مطالعات فوق در تحقیق دیگری نشان داده‌اند که مقدار بالای پیریدوکسین به صورت روزانه باعث تسریع تغییرات نوروپاتی محیطی می‌شود (۱۴). همچنین در مطالعه بر روی موش‌های صحرایی نیز نشان دادند که مقدار بالای ویتامین B6 باعث بروز نکروز در نورون‌های حسی می‌شود، ولی مکانیسم ایجاد نوروپاتی مشخص نشده است (۱۴).

مشخص شده است که کمبود ویتامین B6 باعث بروز التهاب، هیپرهموسیسستینمیا و زخم‌های آترواسکلروتیک می‌شود. هیپرهموسیسستینمیا خود با آسیب عصبی و بروز درد مزمن،



حیوانات با روش کار و کاهش عوامل استرس زا انجام شد. برای ایجاد درد ۲۰ میکرولیتر از محلول فرمالین ۵ درصد توسط سرسوزن شماره ۲۸ در کف پای حیوان به صورت زیر جلدی تزریق و سپس حیوان در داخل ظرف استوانه ای قرار داده شده و به مدت یک ساعت از آینه حرکات حیوان فیلم برداری شد. سپس از روی فیلم‌ها مدت زمان لیسیدن و گاز گرفتن پنجه پای تزریق شده با استفاده از کروномتر، بر حسب ثانیه تا یک دهم ثانیه، در فواصل زمانی ۵ دقیقه ای به مدت یک ساعت محاسبه شد. در تحقیقات مربوط به درد فرمالینی در موش سوری، ارزیابی رفتار حیوان به دو صورت دادن نمره و ثبت زمان رفتارهای مختلف انجام می‌گیرد. با توجه به اینکه موش سوری از نظر جثه کوچک و حرکات بسیار سریعی دارد، از روش دادن نمره کمتر استفاده می‌شود و ثبت زمان رفتارها به ویژه مدت زمان لیسیدن و گاز گرفتن پنجه پای تزریق شده، ارجحیت دارد (۱،۱۱،۲۶).

بعد از انجام آزمایشات داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای معیار بیان شده و جهت آنالیز داده‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و به دنبال آن تست‌های مقایسه چندگانه توکی استفاده گردید. مقدار $P < 0.05$ برای تعیین سطح معنی داری بین گروه‌ها در نظر گرفته شد.

نتایج

۱- ایجاد پاسخ درد متعاقب تزریق کف پای سالیین نرمال و فرمالین: تزریق کف پای سالیین نرمال دو بار با فاصله پنج دقیقه باعث بروز پاسخ درد ضعیف ($3/7 \pm 11/9$ ثانیه) فقط در پنج دقیقه اول پس از تزریق شد که نسبت به پنج دقیقه‌های بعدی اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) نشان داد. تزریق کف پای فرمالین پنج دقیقه پس از تزریق کف پای سالیین نرمال موجب افزایش شدید و معنی دار ($P < 0.05$) در مدت زمان لیسیدن و گاز گرفتن پنجه پای تزریق شده، در پنج دقیقه‌های اول، چهارم، پنجم، ششم، هفتم، هشتم و نهم نسبت به بقیه پنج دقیقه‌ها شد. تزریق کف پای سالیین نرمال ۱۵ دقیقه پس از تزریق داخل صفاقی سالیین نرمال فقط در پنج دقیقه اول بطور معنی دار ($P < 0.05$) موجب بروز درد شد. تزریق کف پای فرمالین ۱۵ دقیقه پس از تزریق داخل صفاقی سالیین نرمال موجب ایجاد پاسخ درد معنی دار ($P < 0.05$) در پنج دقیقه‌های اول، چهارم، پنجم، ششم، هفتم، هشتم و نهم نسبت به بقیه پنج دقیقه‌ها شد. بین گروه دریافت کننده سالیین نرمال (کف پای) و سالیین نرمال (کف پای) با گروه دریافت کننده سالیین نرمال

پرورشی از جنس پلی بیکرنات در آزمایشگاه با حرارت ۲۴-۲۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و رطوبت ثابت نگهداری شدند. غذا از نوع پلت تجارتي و آب بطور آزاد در دسترس حیوانات قرار داشت. موش‌ها هر روز سه بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه تیمار شدند. تمام آزمایشات بین ساعت ۱۶-۱۰ انجام شد. ویتامین B6 و فرمالین از شرکت مرک خریداری شدند و در نرمال سالیین ۰/۹ درصد حل گردیدند.

حیوانات به صورت تصادفی در گروه‌های درمانی قرار داده شدند (۸ گروه و برای هر گروه $n=10$). ویتامین B6 و سرم فیزیولوژی به صورت صفاقی با حجم ثابت و بر اساس وزن هر حیوان (۱۰ میلی لیتر به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) تجویز شدند. تجربه حاضر در دو مرحله انجام شد. مرحله اول که هدف آن ارزیابی اثر موضعی (تزریق کف پای) ویتامین B6 بود، از چهار گروه ده تایی موشهای سوری به ترتیب زیر استفاده شد: در گروه اول محلول سالیین نرمال به فاصله پنج دقیقه دو بار در کف پا (با حجم ۲۰ میکرولیتر) تزریق شد، در گروه دوم ابتدا تزریق کف پای سالیین نرمال و پنج دقیقه بعد تزریق کف پای فرمالین (۵ درصد با حجم ۲۰ میکرولیتر) انجام شد، گروه سوم ابتدا بطور کف پای ویتامین B6 (۵ درصد با حجم ۲۰ میکرولیتر) و پنج دقیقه بعد بطور کف پای سالیین نرمال دریافت کردند. در گروه چهارم ابتدا ویتامین B6 و پنج دقیقه بعد فرمالین به روش کف پای تزریق شد. مرحله دوم که هدف آن بررسی اثر داخل صفاقی ویتامین B6 بود از چهار گروه ده تایی موشهای سوری به ترتیب زیر استفاده شد: در گروه اول ابتدا تزریق داخل صفاقی سالیین نرمال و ۱۵ دقیقه بعد تزریق کف پای سالیین نرمال، در گروه دوم ابتدا تزریق داخل صفاقی سالیین نرمال و ۱۵ دقیقه بعد تزریق کف پای فرمالین، در گروه سوم ابتدا تزریق داخل صفاقی ویتامین B6 (با دوز ۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و ۱۵ دقیقه بعد تزریق کف پای سالیین نرمال و در گروه چهارم ابتدا تزریق داخل صفاقی ویتامین B6 و ۱۵ دقیقه بعد تزریق کف پای فرمالین انجام شد.

برای ایجاد و بررسی رفتار درد (آزمون فرمالین) از دستگاه آینه درد (MPA) استفاده شد. دستگاه آینه درد از سه قسمت پایه، ظرف استوانه شیشه ای و آینه تشکیل شده است. ظرف استوانه ای بر روی شیشه و آینه با زاویه ۴۵ درجه در داخل پایه قرار داده می‌شود، به طوری که مشاهده و یا فیلم برداری حرکات حیوان از آینه کاملاً امکان پذیر باشد. حیوانات سه روز متوالی و هر روز ۳۰ دقیقه در دستگاه آینه درد قرار داده شدند. این عمل به منظور سازگاری

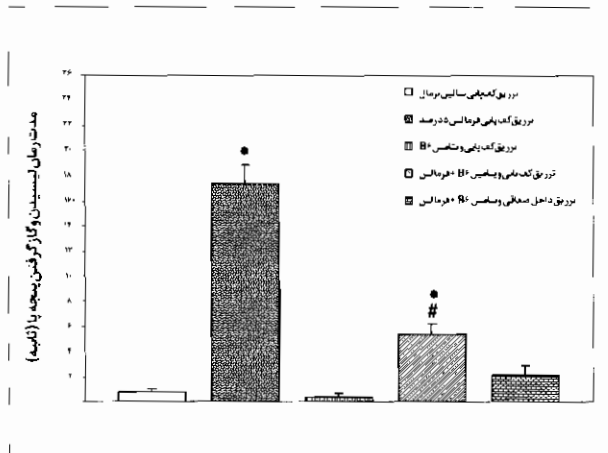


جدول شماره ۱: اثر تزریق کف پایبی و داخل صفاقی سالیین نرمال قبل از تزریق کف پایبی سالیین نرمال و فرمالین بر پاسخ درد (مدت زمان لیسیدن و گاز گرفتن پنجه پای تزریق شده) در موش سوری.

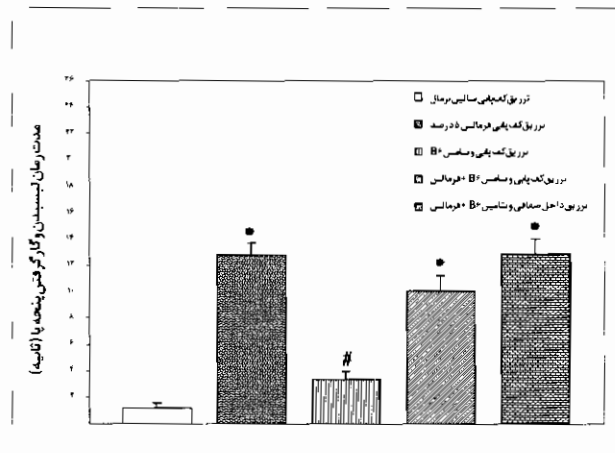
فواصل زمانی پنج دقیقه‌ای												زمان شاخص
۵۵	۵۰	۴۵	۴۰	۳۵	۳۰	۲۵	۲۰	۱۵	۱۰	۵	۰	
تا	تا	تا	تا	تا	تا	تا	تا	تا	تا	تا	تا	تا
۶۰	۵۵	۵۰	۴۵	۴۰	۳۵	۳۰	۲۵	۲۰	۱۵	۱۰	۵	۰
۰	۰	۰	۰	۱/۳	۰	۲/۱	۰	۳/۵	۳/۶	۵/۶	۱۱/۹*	۰
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
۰	۰	۰	۰	۰/۸	۰	۱/۱	۰	۱/۹	۱/۸	۱/۸	۳/۷	۰
۴/۴	۴/۹	۵/۴	۱۸/۹*#	۲۲/۳*#	۲۲/۱*#	۲۶/۳*#	۳۳/۶*#	۳۵/۵*#	۸/۱	۸/۹	۱۱۶/۷*#	۰
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
۲/۲	۱/۹	۱/۹	۱/۹	۳/۹	۴/۷	۳/۶	۴/۸	۵/۷	۳/۹	۳	۹/۸	۰
۰	۰	۰	۰	۰/۹	۰	۰	۱/۱	۲/۳	۲/۸	۴/۸	۱۱/۶*	۰
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
۰	۰	۰	۰	۰/۶	۰	۰	۰/۷	۱/۶	۱/۴	۱/۵	۳/۴	۰
۲/۳	۵/۶	۸/۱	۲۱/۳*#	۲۴/۴*#	۲۸/۴*#	۲۴/۳*#	۳۱*#	۴۵*#	۶/۵	۱۰/۹	۱۲۸*#	۰
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
۲	۲/۳	۲/۷	۳/۶	۳/۹	۷/۵	۳/۵	۵/۴	۷/۳	۲	۳/۴	۹/۱	۰

*p<۰/۰۵: در مقایسه با سایر پنج دقیقه‌ها در هر ردیف

#p<۰/۰۵: در مقایسه با سایر گروه‌ها در هر ستون



نمودار شماره ۲: اثر تزریق کف پایبی و داخل صفاقی ویتامین B6 بر پاسخ درد مرحله دوم (دقایق ۴۵-۱۵) ناشی از تزریق کف پایبی فرمالین ۵ درصد در موش سوری. *p<۰/۰۵: در مقایسه با بقیه گروه‌ها و #p<۰/۰۵: در مقایسه با گروه فرمالین است.



نمودار شماره ۱: اثر تزریق کف پایبی و داخل صفاقی ویتامین B6 بر پاسخ درد مرحله اول (دقایق ۵-۰) ناشی از تزریق کف پایبی فرمالین ۵ درصد در موش سوری. *p<۰/۰۵: در مقایسه با بقیه گروه‌ها و #p<۰/۰۵: در مقایسه با بقیه گروه‌ها به غیر از گروه سالیین نرمال است.

(۱)

۲- اثر تزریق کف پایبی و داخل صفاقی ویتامین B6 بر پاسخ درد ناشی از تزریق کف پایبی فرمالین: تزریق کف پایبی فرمالین پنج درصد به حجم ۲۰ میکرولیتر موجب افزایش معنی دار (P<۰/۰۵) در مدت زمان لیسیدن و گاز گرفتن پنجه پانسیبت به تزریق کف پایبی سالیین نرمال به حجم مشابه در ۵ دقیقه اول پس از تزریق کف پایبی ویتامین B6 به تنهایی تغییر معنی داری در مقایسه با گروه شاهد در پاسخ درد مرحله اول (دقایق ۵-۰) ایجاد نکرد. همچنین تزریق کف پایبی و داخل صفاقی ویتامین B6 قبل از تزریق کف پایبی فرمالین ۵ درصد از افزایش درد ناشی از فرمالین در دقایق ۵-۰ پس

(داخل صفاقی) و سالیین نرمال (کف پایبی) اختلاف معنی دار وجود نداشت. بین گروه دریافت کننده سالیین نرمال (کف پایبی) و فرمالین (کف پایبی) با گروه دریافت کننده سالیین نرمال (داخل صفاقی) و فرمالین (کف پایبی) اختلاف معنی دار مشاهده نشد. بین گروه‌های دریافت کننده سالیین نرمال کف پایبی و دریافت کننده فرمالین کف پایبی در پنج دقیقه‌های اول، چهارم، پنجم، ششم، هفتم، هشتم و نهم اختلاف معنی دار (P<۰/۰۵) بروز کرد. در نتیجه فرمالین درد دو مرحله‌ای (مرحله اول: ۵-۰ و مرحله دوم: ۴۵-۱۵ دقیقه پس از تزریق فرمالین) ایجاد می‌کند (جدول شماره



می شود. با توجه به اینکه در این پنج دقیقه ها نسبت به زمانهای دیگر واکنشهای درد بسیار شدید بود، می توان نتیجه گرفت که درد به صورت دو مرحله ای (مرحله اول: ۵-۰ و مرحله دوم ۴۵-۱۵ دقیقه پس از تزریق) ظاهر می شود. در تحقیقات مربوط به درد برای ایجاد درد و بررسی واکنشهای رفتاری، هورمونی، احشایی و الکترو فیزیولوژی درد، از مواد در دوزا مثل اسید استیک، برادی کینین، پروستاگلاندین ها، یون پتاسیم، هیستامین، سروتونین و نیکوتین استفاده شده است. در همین رابطه از فرمالین به طور گسترده ای استفاده شده و واکنش های رفتاری آن استاندارد و به تست فرمالینی معروف شده است (۲۶). در این تست غلظت های مختلف فرمالین از ۰/۱ تا ۵ درصد با حجم های متفاوت از ۱۰ تا ۵۰ میکرو لیتر، در قسمت های مختلف بدن از جمله کف دست و پا، لب بالا، داخل صفاق و داخل کولون به منظور ایجاد و بررسی واکنش های رفتاری و هورمونی، دردهای پیکری و احشایی تزریق می شود (۱۰، ۱۷، ۲۱، ۲۵). متعاقب تزریق فرمالین پاسخ های رفتاری مثل لیسیدن، گاز گرفتن، جویدن و بی حرکت نگه داشتن عضو تزریق شده به صورت دو مرحله ای ثبت شده است. مرحله اول آن بلافاصله پس از تزریق برای مدت ۱۰-۵ دقیقه (تحت عنوان درد نوروژنیک) و مرحله دوم آن از ۲۰-۱۵ دقیقه پس از تزریق به مدت ۴۰-۳۰ دقیقه بصورت افزایش در رفتار (تحت عنوان درد التهابی) مشخص می شود. بین دو مرحله مذکور یک فاصله زمانی ۱۵-۵ دقیقه ای بصورت کاهش واکنش های درد وجود دارد (۱۱، ۱۷، ۲۵، ۲۶). در مطالعه حاضر نیز برای ایجاد درد و بررسی واکنش های درد در موش های سوری از غلظت ۵ درصد فرمالین با حجم ۲۰ میکرو لیتر استفاده شده است و همانطور که گفته شد استفاده از غلظت های مختلف فرمالین در کف پای موش های سوری درد ایجاد می کند (۲۶). از طرف دیگر واکنش های درد با اندازه گیری مدت زمان لیسیدن و گاز گرفتن پای مورد نظر ثبت شده که بر اساس تجربیات ذکر شده، این روش ثبت رفتار در موش های سوری، بهتر از روش نمره دادن می باشد (۱۷، ۱۹، ۲۶). در یک مطالعه، مدت زمان لیسیدن و گاز گرفتن پنجه پای تزریق شده با فرمالین ۵ درصد در فواصل زمانی ۵-۰ و ۴۰-۲۰ دقیقه پس از تزریق شدید بوده است (۱). در نتیجه، دو مرحله ای بودن درد فرمالینی در مطالعه حاضر، هیچگونه تضادی با گزارش های قبلی ندارد و بطور کامل آشکار می کند که فرمالین درد دو مرحله ای ایجاد می کند.

۲- اثر تزریق موضعی و داخل صفاقی ویتامین B6 بر رفتار درد

ناشی از تزریق کف پای فرمالین

از تزریق جلوگیری نکرد (نمودار شماره ۱).

تزریق کف پای فرمالین پنج درصد به حجم ۲۰ میکرو لیتر موجب افزایش معنی دار ($P < 0/05$) در پاسخ درد فرمالینی نسبت به تزریق کف پای سالین نرمال به حجم مشابه در ۴۵-۱۵ دقیقه پس از تزریق شد. تزریق کف پای ویتامین B6 به تنهایی تغییر معنی داری در مقایسه با گروه شاهد (سالین نرمال) در پاسخ درد مرحله دوم (دقیق ۴۵-۱۵) ایجاد نکرد. تزریق کف پای و یا داخل صفاقی ویتامین B6 قبل از تزریق کف پای فرمالین ۵ درصد از افزایش درد ناشی از فرمالین در دقیق ۴۵-۱۵ پس از تزریق بطور معنی دار ($P < 0/05$) جلوگیری کرد. اثر ضد دردی ویتامین B6 (با تزریق داخل صفاقی) بیشتر از اثر آن به روش تزریق کف پای بود (نمودار شماره ۲).

بحث و نتیجه گیری

با توجه به نتایج بدست آمده بحث در دو محور زیر انجام شده است:

۱- ایجاد و بررسی رفتار درد در موش های سوری متعاقب تزریق

کف پای فرمالین پنج درصد

نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که تزریق سالین نرمال با حجم ۲۰ میکرو لیتر در زیر پوست سطح داخلی (کف) پنجه پای موش های سوری، واکنش رفتاری بسیار خفیف فقط در ۵ دقیقه اول پس از تزریق ایجاد می کند. از تزریق سالین نرمال در حجم های مختلف بسته به روش تحقیق به عنوان شاهد در اکثر مطالعات استفاده می شود و شاید مهمترین دلیل استفاده از آن ایزوتونیک بودن محلول است که واکنش های مربوط به تونوسیت و فشار را در محل تزریق ایجاد نمی کند (۶، ۱۷). احتمال ایجاد واکنش های ضعیف درد در پنج دقیقه اول پس از تزریق سالین نرمال می تواند ناشی از وارد شدن سر سوزن به زیر پوست باشد. علی رغم اینکه تزریق زیر پوستی در مطالعه حاضر با سر سوزن شماره ۲۸ انجام شده است ولی وارد شدن سر سوزن در هر شماره ای به بافت ها، به علت تحریک گیرنده های درد معمولاً با واکنش های درد همراه است (۲۶). در مطالعات قبلی نیز با تزریق سالین نرمال با حجم ۲۰ میکرو لیتر در کف پای موش های سوری واکنش های ضعیف درد در ۵ دقیقه اول پس از تزریق گزارش شده است (۱، ۲۶).

در مطالعه حاضر پس از تزریق کف پای فرمالین ۵٪ با حجم ۲۰ میکرو لیتر، واکنش های لیسیدن و گاز گرفتن پای تزریق شده در ۵ دقیقه های اول، چهارم، پنجم، ششم، هفتم، هشتم و نهم ایجاد



اثر سینرژستیکی در اثرات ضد دردی دیکلوفناک می‌شود و این اثرات به صورت وابسته به دوز با افزایش مقدار ویتامین B6 افزایش می‌یابد (۲۳). در مطالعه‌ای، Caram-Salas و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که ویتامین‌های گروه B در موش صحرایی باعث کاهش درد در مدل درد نوروپاتی می‌شوند و این اثرات ضد دردی با مصرف همزمان دگزمتازون افزایش می‌یابد (۳). با توجه به مکانیسم اثر دیکلوفناک و دگزمتازون (مهمل ستنز پروستاگلاندین‌ها، اثرات مرکزی ضد درد و اثر روی آزاد سازی محیطی نیتریک اکساید) (۳،۲۳) این احتمال وجود دارد که ویتامین B6 نیز با مکانیسم مشابه و جایگاه یکسان با این داروها عمل کند.

مشخص شده است که کاهش میزان گردش خونی ویتامین B6 موجب افزایش التهاب می‌شود (۱۲). نتایج مطالعات بر روی موش صحرایی و انسان نشان می‌دهد که التهاب و درد ارتباط مستقیم با میزان ویتامین B6 دارد. چنانچه در موش‌های صحرایی Lewis که مدل مناسبی برای التهاب می‌باشند، مشخص شد که کاهش پیریدوکسال ۵- فسفات در گردش خون باعث کاهش میزان غلظت پلاسمایی این ماده شده و در طول التهاب حیوانات مبتلا به آرتریت، یک ارتباط مستقیم بین غلظت این ماده در پلازما و تشدید التهاب در آرتریت روماتوئید وجود دارد، چنانچه به نظر می‌رسد این ارتباط در انسان نیز مشخص شده است (۵). میزان متوسط غلظت پلاسمایی پیریدوکسال ۵- فسفات در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید نسبت به افراد سالم، حدود ۵۵ درصد کاهش نشان می‌دهد. در موش‌های صحرایی مدل آرتریت نیز این میزان ۵۳ درصد بوده و با مطالعات انسانی هم خوانی دارد (۵). این مطالعات پیشنهاد می‌کنند که یک ارتباط سببی بین ویتامین B6 و بروز درد و التهاب وجود دارد. کاهش درد و التهاب ناشی از تزریق داخل صفاقی ویتامین B6 در مطالعه حاضر می‌تواند ناشی از این باشد که افزایش گردش خونی ویتامین B6 توانایی کاهش التهاب را دارد.

با توجه به مطالعات قبلی مکانیسم‌های اثر ضد دردی و ضد التهابی احتمالی که برای ویتامین‌های گروه B بخصوص ویتامین B1، B6 و B12 مطرح کرده‌اند به قرار زیر است:

۱- اثرات عمومی ویتامین‌های گروه B بر روی عملکرد آکسونی، که پیشنهاد می‌کنند ویتامین B1 ممکن است یک نقش بیوفیزیولوژیکال مهم در عملکرد و تحریک پذیری نورونها داشته باشد. از طرف دیگر ویتامین B12 به طور انتخابی عملکرد اعصاب

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که تزریق داخل صفاقی و موضعی ویتامین B6 فقط بر مرحله دوم درد اثر داشته و رفتار درد مرحله اول را کاهش نمی‌دهد. بطوریکه قبلاً نیز توضیح داده شد مرحله اول درد ناشی از فرمالین یک درد نورونیک بوده و با تحریک مستقیم گیرنده‌های درد (نوسیسپتورها) ایجاد می‌شود و در این مرحله هیچ نوع واسطه شیمیایی شرکت نمی‌کند (۱۱،۱۹،۲۶) و چنین می‌توان پیشنهاد کرد که این دارو اثر مستقیم ضد دردی نداشته و ویتامین B6 اثری در حفاظت از گیرنده‌ها ایجاد نکرده است. از طرف دیگر مرحله دوم درد فرمالینی یک درد التهابی است و با دخالت انواع واسطه‌های التهابی مثل پروستاگلاندین‌ها، برادی کینین‌ها، هیستامین و آنزیم‌ها ایجاد می‌شود (۱۱،۱۹،۲۶). با توجه به اینکه در مطالعه حاضر ویتامین B6 فقط پاسخ درد مرحله دوم را بطور معنی داری کاهش داد، چنین می‌توان پیشنهاد کرد که ویتامین B6 اثر مهملی بر آزاد سازی واسطه‌های التهابی دارد.

در مدل‌های مختلفی، اثرات ضد دردی و ضد التهابی ویتامین B6 را گزارش کرده‌اند. به طوری که Franca و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند که مقادیر مختلف ویتامین B6 در مدل التهابی بنزو کوئینون و اسید استیک در موش صحرایی، پاسخ درد را تا ۵۰ درصد کاهش می‌دهد (۱۱). آنها همچنین گزارش کردند که تزریق داخل صفاقی ویتامین‌های گروه B پاسخ درد و التهاب مرحله دوم ناشی از فرمالدئید را کاهش می‌دهد. در مطالعه مشابه Franca و همکاران (۲۰۰۱) اثرات ضد التهابی ویتامین B6 را در مدل صفحه داغ نشان دادند و گزارش کردند که این اثرات ضد دردی و ضد التهابی با داروهای NSAID افزایش یافته، ولی با تزریق نالوکسان تغییری نمی‌کند و نتیجه گرفتند که سیستم اویوئیدی در اثرات ضد دردی ویتامین B6 نقش فعال ندارد (۱۱). Reyes و همکاران (۱۹۹۹) گزارش کردند که ویتامین‌های گروه B اثرات ضد دردی دیکلوفناک را در مدل‌های مختلف آزمایشگاهی درد در حیوانات افزایش می‌دهند. آنها همچنین با استفاده همزمان ویتامین B6 و دیکلوفناک در مدل التهابی مفصل (تزریق داخل مفصلی اسید اوریک) در موش‌های صحرایی نشان دادند که پیریدوکسین اثرات ضد التهابی دیکلوفناک را افزایش می‌دهد (۲۳). در انسان نیز ویتامین‌های B به عنوان تجویز همراه با دیکلوفناک برای درمان درد مهره‌های کمراستفاده شده و نتیجه مطلوبی نشان داده است (۲۳). مطالعه Reyes و همکاران (۱۹۹۹) نشان می‌دهد که تجویز همزمان داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی با ویتامین B6، باعث



حسی رامهار می‌کند (۱۱،۲۳).

۲- اثرات مرکزی ویتامین‌های B، که باعث افزایش فعالیت نورونهای شاخ پستی نخاع و تالاموس می‌شود. این اثرات ممکن است به دلیل تغییر در سنتز نوروترنسمیترهایی که نقش مهمی در تعدیل پاسخ درد در CNS دارند، صورت گیرد (۱۱،۲۳). مهار طولانی مدت درد احتمالا ممکن است به دلیل تداخل‌های شدید ویتامین‌های B با گیرنده‌های داخل نخاعی و خارج نخاعی یا به دلیل اثر روی آزادسازی اوپیوئیدهای درونزا و یا احتمالا به دلیل اثر مهاری روی سیستم‌های نوروترنسمیترهای غیر اوپیوئیدی مثل سیستم سروتونرژیک و گابااژیک باشد. به طوری که کمبود ویتامین B6 باعث کاهش سنتز ۵- هیدروکسی تریپتامین، دوپامین و سایر نوروترنسمیترها در هیپوتالاموس می‌شود و درمان با پیریدوکسین باعث افزایش سنتز سروتونین در مغز می‌شود (۱۱،۲۳). با توجه به اینکه ویتامین B6 در سنتز گابا به عنوان کوآنزیم عمل می‌کند و از طرف دیگر گابا در محل التهاب، نخاع و راههای مغزی مربوط به درد، در هنگام تحریک آسیب رسان آزاد می‌شود، احتمالا اثر کاهش دهنده درد ایجاد می‌کند (۲۰).

۳- نشان داده‌اند که مسیر پیام‌رسانی گوانوزین مونوفسفات حلقوی (cGMP) ممکن است در اثرات ضد دردی ویتامین‌های گروه B نقش داشته باشد. به طوری که مشخص شده است ویتامین‌های B کمپلکس، محرک قوی تولید گوانوزین مونوفسفات حلقوی در بافت‌های مختلف هستند. گوانوزین مونوفسفات حلقوی نقش مهمی در اثرات ضد دردی داروها بازی می‌کند. ویتامین‌های گروه B ممکن است با فعال کردن گوانیل سیکلاز و تولید cGMP اثرات ضد دردی داشته باشند. به طوری که تزریق داخل نخاعی ویتامین‌های B باعث مهار درد، با اثر روی مسیر پیام‌رسانی cGMP-PKG می‌شود (۲۷). از طرف دیگر مشخص شده است که فعال شدن بعضی از پیامبرهای داخل سلولی از جمله cAMP و cGMP و پروتئین‌کیناز G می‌تواند در تغییر علائم درد از موضع و یادرنخاع نقش داشته باشد. با توجه به اینکه ویتامین‌های گروه B توانایی تغییر واسطه ثانویه در داخل سلول را دارند، نتیجه گرفته‌اند که کاهش درد حاصل از ضایعات اعصاب محیطی توسط ویتامین‌های گروه B می‌تواند به علت فعال شدن این واسطه‌های شیمیایی باشد (۲۷).

۴- گلوتامات و کانالهای کلسیمی نقش مهمی در انتقال نورونی و درد بازی می‌کنند و نشان داده‌اند که پیریدوکسین ممکن است میزان داخل سلولی گلوتامات و کلسیم را کاهش دهد

(۷،۲۷).

۵- ویتامین‌های گروه B احتمالا در بازسازی نورونهای دژنره شده نقش مهمی داشته و باعث برگشت عملکرد نورونها در طول درد می‌شوند (۱۳،۲۷).

۶- نشان داده‌اند که اثرات ضد دردی ویتامین‌های گروه B با استفاده همزمان داروهای ضد التهاب غیراستروئیدی (NSAIDs) بخصوص دیکلوفناک افزایش می‌یابد و ویتامین‌های B به تنهایی اثرات ضد التهابی کمی نسبت به استفاده همزمان با داروهای NSAID در مدل‌های مختلف آزمایشگاهی درد و التهاب دارند و چنین می‌توان پیشنهاد کرد که احتمالا ویتامین‌های گروه B ممکن است با جایگاه مشابه داروهای NSAID عمل کنند. از طرف دیگر گزارش کرده‌اند که ویتامین B6 باعث مهار سنتز پروستاگلاندین E2، ترومبوکسان B2 و لوکوترین E4 در انسان می‌شود (۱۱،۲۲،۲۳،۲۷).

مطالعه حاضر نشان داد که اثر تزریق موضعی ویتامین B6 بر پاسخ درد در مرحله دوم درد در مقایسه با تزریق داخل صفاقی کمتر است. نتایج مطالعات محققین مختلف نشان داده‌اند که مقدار بالایی ویتامین‌های B از جمله پیریدوکسین، خود باعث آسیب اعصاب حسی و بروز درد و نوروپاتی می‌شود (۲،۹). پس چنین می‌توان پیشنهاد کرد که علت افزایش پاسخ درد در مرحله دوم در تزریق موضعی ویتامین B6 نسبت به تزریق داخل صفاقی در این مطالعه، احتمالا می‌تواند به مقدار بالای ویتامین B6 تزریق شده در موضع (پنجه پا) ارتباط داشته باشد که خود باعث آسیب عصبی و بروز درد می‌شود.

همانطور که نتایج این تحقیق و مطالعات فوق نشان می‌دهد، برای ویتامین B6 اثر ضد دردی و ضد التهابی می‌توان پیشنهاد نمود و نتایج این مطالعه نیز با نتایج محققین مختلف همخوانی دارد. با توجه به اینکه ویتامین B6 در کنترل عملکرد سلولهای مختلف بخصوص نورونها و آزاد شدن نوروترنسمیترها و مواد شیمیایی از سلولها نقش مهمی دارد (۱۱،۲۲،۲۳،۲۷) چنین می‌توان استنباط کرد که احتمالا اثر ضد دردی و کاهش پاسخ درد در مرحله دوم، بدلیل مهار آزاد شدن واسطه‌های التهابی از سلولها و افزایش عمل واسطه‌های ضد التهابی می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

به طور خلاصه این مطالعه نشان داد که تزریق داخل صفاقی و موضعی ویتامین B6 رفتار دردناشی از فرمالین رامهار کرده و اثر ضد



- 10- Diaz, A., Dickenson, A.H. (1997) Blockade of spinal N- and P-type, but not L-type, calcium channels inhibits the excitability of rat dorsal horn neurones produced by subcutaneous formalin Inflammation. *Pain*, **69**(1-2):93-100.
- 11- França, D.S., Souza, A.L., Almeida, K.R., Dolabella, S.S., Martinelli, C., Coelho, M.M. (2001) B vitamins induce an antinociceptive effect in the acetic acid and formaldehyde models of nociception in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, **421**(3):157-164.
- 12- Friso, S., Jacques, P.F., Wilson, P.W., Rosenberg, I.H., Selhub, J. (2001) Low circulating vitamin B (6) is associated with elevation of the inflammation marker C-reactive protein independently of plasma homocysteine levels. *Circulation*, **103**(23):2788-91.
- 13- Fujii, A., Matsumoto, H., Yamamoto, H. (1996) Effect of vitamin B complex on neurotransmission and neurite outgrowth. *Gen. Pharmacol.*, **27**(6):995-1000.
- 14- Head, K. A. (2006) Peripheral neuropathy pathogenic mechanisms and alternative therapies. *Altern. Med. Rev.*, **11**(4):294-329.
- 15- Jain, S.K., Lim, G. (2001) Pyridoxine and pyridoxamine inhibits superoxide radicals and prevents lipid peroxidation, protein glycosylation, and (Na⁺ + K⁺)-ATPase activity reduction in high glucose-treated human erythrocytes. *Free Radic. Biol. Med.*, **30**(3):232-237.
- 16- Malouf, R., Grimley Evans, J. (2003) The effect of vitamin B6 on cognition. *Cochrane Database Syst Rev.*, **4**:CD004393.
- 17- Ness, T.J. (1999) Models of visceral nociception. *ILAR J.*, **40**(3):119-128.
- 19- Porro, C.A., Cavazzuti, M. (1993) Spatial and temporal aspects of spinal cord and brainstem activation in the formalin pain model. *Prog. Neurobiol.*, **41**(5):565-607.
- 20- Rees, H., Sluka, K.A., Westlund, K.N., Willis, W.D.W. (1995) The role of glutamate and GABA receptors in the generation of dorsal root reflexes by acute arthritis in the anaesthetized rats. *J. Physiol.*, **484**:437-445.
- 21- Ren, K., Dubner, R. (1999) Inflammatory models of pain and hyperalgesia. *ILAR J.*, **40**(3):111-118.
- دردی و ضد التهابی دارد. این اثرات را احتمالاً می توان به نقش ویتامین B6 به عنوان کوآنزیم در سلولهای عصبی از یک طرف و آزاد شدن واسطه های التهابی از سلولها ارتباط داد، ولی بررسی نقش دقیق ویتامین B6 بر درد و التهاب در انسان و مدل های دیگر حیوانی، نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

منابع

- ۱- تمدن فرد، ا.، مجتهدین، ع. (۱۳۸۳) اثر تزریق داخل صفاقی سایمتیدین بر پاسخ درد ناشی از فرمالین در موش های سوری. *مجله دانشکده دامپزشکی تهران*، دوره ۵۹، شماره ۴، صفحه ۳۷۸-۳۷۳.
- 2- Arkaravichien, T., Sattayasai, N., Daduang, S., Sattayasai, J. (2003) Dose-dependent effects of glutamate in pyridoxine-induced neuropathy. *Food Chem Toxicol*, **41**(10):1375-80.
- 3- Caram-Salas, N.L., Reyes-García, G., Medina-Santillán, R., Granados-Soto, V. (2006) Thiamine and cyanocobalamin relieve neuropathic pain in rats: synergy with dexamethasone. *Pharmacology*, **77**(2):53-62.
- 4- Chiang, E.P., Bagley, P.J., Selhub, J., Nadeau, M., Roubenoff, R. (2003) Abnormal vitamin B (6) status is associated with severity of symptoms in patients with rheumatoid arthritis. *Am. J. Med.*, **114**(4):283-287.
- 5- Chiang, E.P., Smith, D.E., Selhub, J., Dallal, G., Wang, Y.C., Roubenoff, R. (2005) Inflammation causes tissue-specific depletion of vitamin B6. *Arthritis Res Ther*, **7**(6):1254-62.
- 6- Choi, S.S., Lee, J.K., Suh, H.W. (2001) Anti nociceptive profiles of aspirin and acetaminophen in formalin, substance P and glutamate pain models. *Brain Res.*, **921** (1-2):233-239.
- 7- Dakshinamurti, K., Sharma, S.K., Geiger, J.D. (2003) Neuroprotective actions of pyridoxine. *Biochim Biophys Acta*, **1647**(1-2):225-229.
- 8- De Angelis, R., Salaffi, F., Filippucci, E., Grassi, W. (2006) Carpal tunnel syndrome treatment. *Reumatismo*, **58**(1):5-10.
- 9- de Kruijk, J.R., Notermans, N.C. (2005) Sensory disturbances caused by multivitamin preparations. *Ned Tijdschr Geneesk*, **149**(46):2541-2544.



- 22- Reyes-García, G., Medina-Santillán, R., Terán-Rosales, F., Castillo-Henkel, C., Vidal-Cantú, G.C., Caram-Salas, N.L., Granados-Soto, V. (2002) B vitamins increase the anti-hyperalgesic effect of diclofenac in the rat. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, **45**:147-149.
- 23- Reyes-García, G., Medina-Santillán, R., Terán-Rosales, F., Mateos-García, E., Castillo-Henkel, C. (1999) Characterization of the potentiation of the antinociceptive effect of diclofenac by vitamin B complex in the rat. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **42**(2):73-77.
- 24- Saibeni, S., Cattaneo, M., Vecchi, M., Zighetti, M.L., Lecchi, A., Lombardi, R., Meucci, G., Spina, L., de Franchis, R. (2003) Low vitamin B (6) plasma levels, a risk factor for thrombosis, in inflammatory bowel disease: role of inflammation and correlation with acute phase reactants. *Am. J. Gastroenterol*, **98**(1): 112-117.
- 25- Shutov, L., Kruglikov, I., Gryshchenko, O., Khomula, E., Viatchenko-Karpinski, V., Belan, P., Voitenko, N. (2006) The effect of nimodipine on calcium homeostasis and pain sensitivity in diabetic rats. *Cell. Mol. Neurobiol.*, **26**(7-8):1541-1557.
- 26- Tjolsen, A., Berge, O.G., Hunskaar, S., Rosland, J.H., Hole, K. (1992) The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, **51**(1):5-17.
- 27- Wang, Z.B., Gan, Q., Rupert, R.L., Zeng, Y.M., Song, X.J. (2005) Thiamine, pyridoxine, cyanocobalamin and their combination inhibit thermal, but not mechanical hyperalgesia in rats with primary sensory neuron injury. *Pain*, **114**(1-2):266-277.

