

## اثر وراپامیل، نیفدیپین و دیلتیازم بر پاسخ درد ناشی از فرمالین در موش سوری

میرهادی خیاط نوری<sup>۱\*</sup>، جواد محمودی<sup>۲</sup>، محمدرضا حسینچی قره‌آغاجی<sup>۳</sup>

۱. گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران

۲. دانش‌آموخته فارماکولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

۳. گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، ارومیه، ایران

\* نویسنده مسئول مکاتبات: [mh.khayatnouri@iaut.ac.ir](mailto:mh.khayatnouri@iaut.ac.ir)

(دریافت مقاله: ۸۷/۱۰/۳۰، پذیرش نهایی: ۸۸/۶/۱)

### چکیده

کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ نقش مهمی در کارکرد سلول‌های قلبی و بافت‌های عصبی و عروقی دارند. وراپامیل، نیفدیپین و دیلتیازم، مهارکننده‌های کانال‌های کلسیمی با کاربرد وسیع برای درمان بیماری‌های قلبی-عروقی می‌باشند. چندین مطالعات نشان داده‌اند که مهارکننده‌های کانال‌های کلسیمی اثرات ضد دردی و ضد التهابی در مدل‌های مختلف حیوانی دارند (اما در همه مدل‌ها این اثرات نشان داده نشده است). هدف از این مطالعه تعیین اثر وراپامیل، نیفدیپین و دیلتیازم بر رفتار درد و التهاب ناشی از فرمالین در موش سوری می‌باشد. در این مطالعه تجربی، وراپامیل، نیفدیپین و دیلتیازم با دوز ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی ۳۰ دقیقه قبل از تزریق کف پای فرمالین ۵ درصد با حجم ۲۰ میکرولیتر تزریق شد. مدت زمان لیسیدن و گاز گرفتن پنجه پای تزریق شده به عنوان پاسخ درد در فواصل زمانی ۵ دقیقه‌ای به مدت یک ساعت ثبت شد. نتایج نشان داد که تزریق کف پای فرمالین یک رفتار درد دو مرحله‌ای (مرحله اول: ۰-۵ و مرحله دوم: ۴۵-۲۰ دقیقه پس از تزریق) ایجاد می‌کند. تزریق داخل صفاقی وراپامیل، نیفدیپین و دیلتیازم قبل از فرمالین، پاسخ درد مرحله دوم (درد التهابی) را به طور معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) کاهش می‌دهد. فقط وراپامیل رفتار درد مرحله اول (درد نوروژنیک) را به طور معنی‌دار کاهش می‌دهد ( $p < 0.05$ ). بر اساس نتایج چنین می‌توان پیشنهاد کرد که وراپامیل، نیفدیپین و دیلتیازم اثر کاهش دهنده درد و درد التهابی ایجاد می‌کنند. این اثر احتمالاً به دلیل مسدود کردن کانال‌های کلسیمی و کاهش جریان کلسیم و در نتیجه کاهش آزاد سازی نوروترانسمیترها و دیگر واسطه‌های درد و التهاب است.

مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ۱۳۸۸، دوره ۳، شماره ۳، ۵۶۳-۵۵۵.

کلمات کلیدی: وراپامیل، نیفدیپین، دیلتیازم، درد، فرمالین، موش سوری

### مقدمه

کاردیومیوپاتی هیپرتروفیک و پنومونی مصرف می‌شوند. در سال‌های اخیر مصرف این داروها به دلیل اثرات جانبی قابل تحمل، به طور گسترده افزایش یافته است (۴). مهارکننده‌های کانال‌های کلسیمی همچون وراپامیل، نیفدیپین و دیلتیازم جریان

آنتاگونیست‌های کانال‌های کلسیمی از دهه ۸۰ میلادی تا به حال برای درمان فشار خون استفاده می‌شوند. از زمان معرفی، این داروها مصارف گسترده‌ای پیدا کرده و برای سایر بیماری‌ها مانند آنژین صدری، تاکی آریتمی‌های فوق بطنی،

یون کلسیم را از طریق کانال‌های کلسیمی حساس به ولتاژ مهار می‌کنند (۶). کانال‌های کلسیمی از زیر واحدهای پلی پپتیدی مختلف با وزن مولکولی متفاوت تشکیل شده است. نشان داده‌اند که کانال‌های کلسیمی در قسمت‌های مختلف CNS مثل قشر مغز، هیپوکمپ، مخچه و نخاع یافت می‌شوند و آنتاگونیست‌های کانال‌های کلسیمی به زیر واحدهای پلی پپتیدی کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ متصل شده و از جریان  $Ca^{2+}$  جلوگیری می‌کنند (۵). مهار کننده‌های کانال‌های کلسیمی فوق عمدتاً بر کانال‌های کلسیمی نوع L اثر می‌گذارند. تعدادی از آنتاگونیست‌های کانال‌های کلسیمی ممکن است از افزایش بیش از حد کلسیم نورون‌ها پیشگیری کنند و احتمالاً این کار را از طریق مهار کانال‌های کلسیمی به صورت غیراختصاصی انجام می‌دهند (۱۲). نشان داده شده است که مهار کننده‌های کانال‌های کلسیمی در مدل‌های حیوانی زیادی اثر محافظتی در بافت عصبی دارند (۱۲). همچنین گزارش کرده‌اند که این داروها اثرات ضد دردی در بعضی از مدل‌ها داشته، ولی در همه مدل‌ها این اثرات ثابت نشده است (۳، ۷، ۹، ۱۳، ۱۵ و ۱۶).

کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ نقش مهمی در کنترل عملکرد سلولی در بافت‌های مختلف مثل قلب، عروق و اعصاب ایفا می‌کنند. اگر چه اهمیت کانال‌های کلسیمی به‌طور واضح در مورد درد به اثبات نرسیده است، ولی شواهد نشان می‌دهند که انسداد فارماکولوژیکی کانال‌های کلسیمی ممکن است اثرات ضد دردی داشته باشد و در درمان دردهای احشایی و سوماتیک مفید است. پیشنهاد می‌کنند که عمل ضد دردی مهار کننده‌های کانال‌های کلسیمی به دلیل کاهش عبور کلسیم است. کلسیم با آزاد شدن نوروترنسمیترها و مواد دیگری که درد و التهاب را تسریع می‌کنند، تداخل دارد. فعال شدن کانال‌های کلسیمی، وابسته به دپولاریزاسیون غشاء بوده و با ورود کلسیم، نوروترنسمیترها و مواد مختلف آزاد شده و باعث رفتار درد می‌شود (۱۵).

اخیراً به مهار کننده‌های کانال‌های کلسیمی به عنوان فاکتورهای ضد درد توجه شده است و در همین رابطه مطرح کرده‌اند که برخی از مهار کننده‌های کانال‌های کلسیمی در مدل‌های پیش درمانگاهی و درمانگاهی درد، اثر ضد درد ایجاد کرده‌اند. به طوری که در یک مطالعه اثر نیمودپین (با نیفدپین در یک خانواده قرار دارد) را بر درد ناشی از حرارت بررسی کرده و نشان داده‌اند که این دارو درد ناشی از گرما را در موش‌های صحرایی مهار می‌کند (۱۳). در بررسی دیگری اثرات ضد دردی نیفدپین و وراپامیل را در مدل تلنگر دمی (tail-flick) نشان داده و پیشنهاد کرده‌اند که نیفدپین و وراپامیل می‌توانند ۳۰ دقیقه بعد از تزریق در موش‌های صحرایی، درد ناشی از تست تلنگر دمی را کاهش دهند (۱۶). اثرات تزریق مزمن نیمودپین و نیفدپین را به مدت ۱۱ روز بر پاسخ درد موش‌های صحرایی بررسی کرده و نشان داده‌اند که هر دو دارو به‌صورت وابسته به دوز درد ناشی از تحریک الکتریکی دم را در موش‌های صحرایی کاهش می‌دهند (۷). در مطالعه مشابه دیگری اثر مهار کننده‌های کانال‌های کلسیمی نوع P، N و T را بر التهاب و درد ناشی از تزریق فرمالین زیرجلدی بررسی کرده و نشان داده‌اند که پیش درمانی با مهار کننده‌های کانال‌های کلسیمی با مقادیر بالا، درد مرحله اول را کاهش داده و بیشترین اثر این داروها بر درد مرحله دوم می‌باشد (۳). در تحقیق دیگری اثر تزریق سیستمیک وراپامیل را بر درد ناشی از تحریک مکانیکی و گرما در موش‌های صحرایی بررسی کرده و نشان داده‌اند که وراپامیل به‌صورت وابسته به دوز باعث مهار پاسخ درد می‌شود (۱۵). همچنین در این مطالعه نقش فارماکولوژیکی مهار کننده‌های کانال‌های کلسیمی، در درمان دردهای احشایی و سوماتیک نشان داده شده است (۱۵)، به‌طوری‌که تزریق داخل نخاعی مهار کننده‌های کانال‌های کلسیمی نوع L در موش‌های صحرایی سبب کاهش دردهای ناشی از تزریقات احشایی و سوماتیک می‌شود. گزارش کرده‌اند که تزریق داخل بطنی - مغزی مهار کننده‌های کانال‌های کلسیمی

و بر اساس وزن هر حیوان (۱۰ میلی‌لیتر به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) تجویز شدند. در ابتدا رفتار درد در حیوانات دریافت کننده نرمال سالین داخل صفاقی همراه با نرمال سالین کف پای (۲۰ میکرولیتر) مورد ارزیابی قرار گرفت و سپس بررسی اثر حامل داروها با تزریق داخل صفاقی نرمال سالین و محلول ۵ درصد توئین ۸۰، ۳۰ دقیقه قبل از تزریق کف پای فرمالین ۵ درصد با حجم ۲۰ میکرولیتر انجام گرفت. در ۳ گروه بعدی، حیوانات در ادامه آزمایش، وراپامیل، نیفدیپین و دیلتیازم را با دوز ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، در زمان ۳۰ دقیقه قبل از تزریق کف پای فرمالین ۵ درصد با حجم ۲۰ میکرولیتر دریافت کردند.

برای ایجاد و بررسی رفتار درد (آزمون فرمالین) از دستگاه آینه درد (MPA) استفاده شد. دستگاه آینه درد از سه قسمت پایه، ظرف استوانه شیشه‌ای و آینه تشکیل شده است. ظرف استوانه‌ای 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 حیوانات با روش کار و کاهش عوامل استرس‌زا انجام شد. برای ایجاد درد ۲۰ میکرولیتر از محلول فرمالین ۵ درصد توسط سرسوزن شماره ۲۸ در کف پای حیوان به صورت زیرجلدی تزریق و سپس حیوان در داخل ظرف استوانه‌ای 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 کرومومتر بر حسب ثانیه تا یک دهم ثانیه در فواصل زمانی ۵ دقیقه‌ای 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

در موش سوری اثرات ضد دردی دارد. در مطالعه دیگری آنتاگونیست‌های کانال‌های کلسیمی نوع N و L، درد و التهاب ناشی از تحریکات مکانیکی و مدل مفصل زانوی ملتهب را در موش‌های صحرایی کاهش داده است (۱۵).

نتایج این مطالعات اثرات ضد دردی برای مهار کننده‌های کانال‌های کلسیمی پیشنهاد می‌کنند و بنابراین احتمال دارد وراپامیل، نیفدیپین و دیلتیازم رفتار درد و التهاب ناشی از تزریق کف پای فرمالین را کاهش دهند. از طرف دیگر بیشتر مطالعات انجام شده توسط محققان در مدل‌های تلنجر دمی، صفحه داغ، تحریک الکتریکی دم و درد نوروپاتی انجام شده است (۷، ۹، ۱۳، ۱۵ و ۱۶) و تحقیقی در داخل و خارج از کشور مبنی بر اثر این ترکیبات بر روی رفتار درد و التهاب ناشی از فرمالین در موش‌های سوری وجود ندارد و تحقیق در این مورد امری ضروری به نظر رسیده و هدف این مطالعه است.

## مواد و روش کار

در این مطالعه تجربی، از تعداد ۶۰ 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 پرورشی از جنس پلی‌بیکربنات 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 به‌طور 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. وراپامیل، نیفدیپین و دیلتیازم از شرکت سیگما و فرمالین و توئین ۸۰ از شرکت مرک خریداری شدند. فرمالین در نرمال سالین ۰/۹ درصد و وراپامیل، نیفدیپین و دیلتیازم در محلول ۵ درصد توئین ۸۰ حل گردیدند.

حیوانات به صورت تصادفی در گروه‌های درمانی قرار داده شدند (۶ گروه و برای هر گروه ۱۰ سر موش). وراپامیل، نیفدیپین و دیلتیازم و حامل‌ها به صورت صفاقی با حجم ثابت

می‌شود و ثبت زمان رفتارها به ویژه مدت زمان لیسیدن و گاز گرفتن پنجه پای تزریق شده ارجحیت دارد (۱ و ۱۴).  
بعد از انجام آزمایشات داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار بیان شده و جهت آنالیز داده‌ها در زمان‌های یکسان از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و به دنبال آن از تست‌های مقایسه چندگانه توکی و در زمان‌های تکرار شده از آزمون تی زوجی استفاده گردید. مقدار  $p < 0/05$  برای تعیین سطح معنی‌داری بین گروه‌ها در نظر گرفته شد.

### نتایج

تزریق کف پای سالیین نرمال ۳۰ دقیقه پس از تزریق داخل صفاقی سالیین نرمال، فقط در ۵ دقیقه اول به طور معنی‌دار ( $p < 0/05$ ) موجب بروز درد شد. البته در ۵ دقیقه‌های بعدی نیز

افزایش پاسخ مشاهده می‌شود ولی از نظر آماری معنی‌دار نیستند. تزریق کف پای فرمالین، ۳۰ دقیقه پس از تزریق داخل صفاقی سالیین نرمال موجب ایجاد پاسخ درد معنی‌دار ( $p < 0/05$ ) در ۵ دقیقه‌های اول، چهارم، پنجم، ششم، هفتم، هشتم و نهم نسبت به بقیه ۵ دقیقه‌ها شد (جدول ۱)، در نتیجه فرمالین درد دو مرحله‌ای (مرحله اول: ۵-۰ و مرحله دوم: ۴۵-۲۰ دقیقه پس از تزریق) ایجاد می‌کند. بین گروه‌های دریافت کننده توئین ۸۰ به صورت داخل صفاقی همراه با فرمالین (کف پای) با گروه دریافت کننده سالیین نرمال (داخل صفاقی) و فرمالین (کف پای) اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، پس حلال به کار رفته تأثیر معنی‌داری روی رفتار درد ندارد (جدول ۱ و نمودارهای ۱ تا ۳).

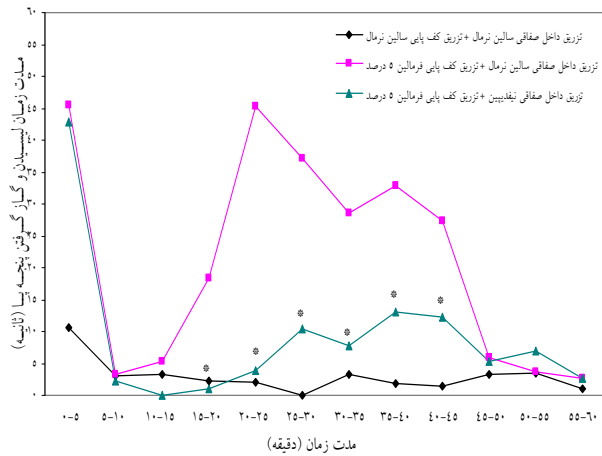
جدول ۱- اثرات تزریق داخل صفاقی سالیین نرمال و توئین ۸۰ قبل از تزریق کف پای سالیین نرمال و فرمالین بر پاسخ درد (مدت زمان لیسیدن و گاز گرفتن پنجه

پای تزریق شده) در موش سوری

زمان شاخص	۰-۵	۵-۱۰	۱۰-۱۵	۱۵-۲۰	۲۰-۲۵	۲۵-۳۰	۳۰-۳۵	۳۵-۴۰	۴۰-۴۵	۴۵-۵۰	۵۰-۵۵	۵۵-۶۰
تزریق داخل صفاقی سالیین نرمال + تزریق کف پای سالیین نرمال	۱۰/۷±۳/۳*	۳/۱±۱/۸	۳/۲±۲/۱	۲/۲±۰/۹	۱/۹±۰/۹	۰±۰	۳/۲±۱/۴	۱/۷±۰/۷	۱/۴±۰/۴	۳/۲±۱/۹	۳/۴±۱/۳	۱/۱±۰/۷
تزریق داخل صفاقی سالیین نرمال + تزریق کف پای فرمالین	۴۸/۷±۲/۶*	۵/۷±۰/۸	۷/۲±۳/۸	۱۴/۲±۵/۳*	۴۳/۹±۷/۵*	۳۹/۲±۶/۹*	۳۰/۷±۶/۲*	۳۰/۱±۷/۹*	۲۸/۱±۴/۸*	۹/۱±۳/۹	۲/۱±۱/۸	۴/۲±۲/۳
تزریق داخل صفاقی توئین ۸۰ + تزریق کف پای فرمالین	۴۵/۴±۳/۶*	۳/۲±۰/۸	۵/۳±۲/۲	۱۸/۳±۵/۴*	۴۵/۳±۸/۱*	۳۷/۲±۷/۲*	۲۸/۴±۵/۳*	۳۲/۷±۸/۹*	۲۷/۴±۴/۲*	۵/۹±۲/۵	۳/۷±۱/۹	۲/۶±۱/۴

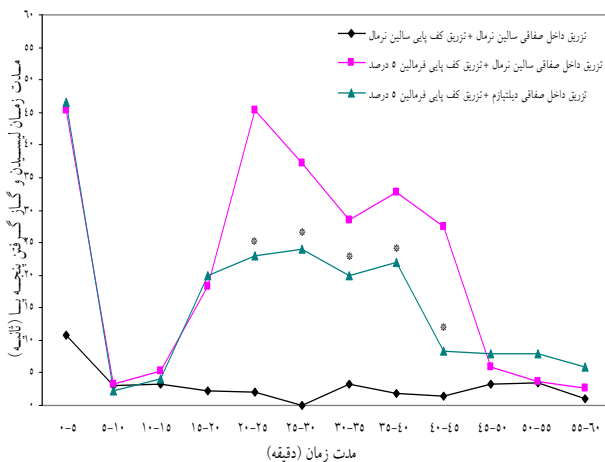
\* $p < 0/05$  در مقایسه با سایر ۵ دقیقه‌ها در هر ردیف

\* $p < 0/05$  در مقایسه با سایر ۵ دقیقه‌ها در هر ستون

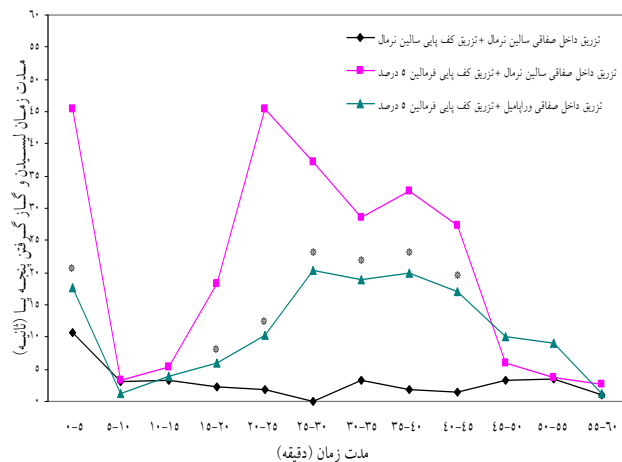


**نمودار ۲-** اثر نیفدیپین بر رفتار درد (مدت زمان لیسیدن و گاز گرفتن پنجه پا) ناشی از فرمالین.  $p < 0.05$ \* در مقایسه با گروه دریافت کننده سالین نرمال به صورت داخل صفاقی.

تزریق داخل صفاقی وراپامیل، قبل از تزریق کف پای فرمالین نشان داد که این دارو به طور معنی داری ( $p < 0.05$ ) رفتار درد ناشی از فرمالین (مدت زمان لیسیدن و گاز گرفتن پنجه پا) را در مرحله اول (۵ دقیقه اول) و مرحله دوم (۵ دقیقه های چهارم، پنجم، ششم، هفتم، هشتم و نهم) کاهش می دهد (نمودار ۱). تزریق داخل صفاقی نیفدیپین و دیلتیازم قبل از تزریق کف پای فرمالین نشان داد که هر دو داروی فوق به طور معنی داری ( $p < 0.05$ ) فقط رفتار درد مرحله دوم را (۵ دقیقه های چهارم (به غیر از دیلتیازم)، پنجم، ششم، هفتم، هشتم و نهم) کاهش می دهند و اثر معنی داری بر درد مرحله اول (۵ دقیقه اول) ندارند (نمودار ۲ و ۳).



**نمودار ۳-** اثر دیلتیازم بر رفتار درد (مدت زمان لیسیدن و گاز گرفتن پنجه پا) ناشی از فرمالین.  $p < 0.05$ \* در مقایسه با گروه دریافت کننده سالین نرمال به صورت داخل صفاقی.

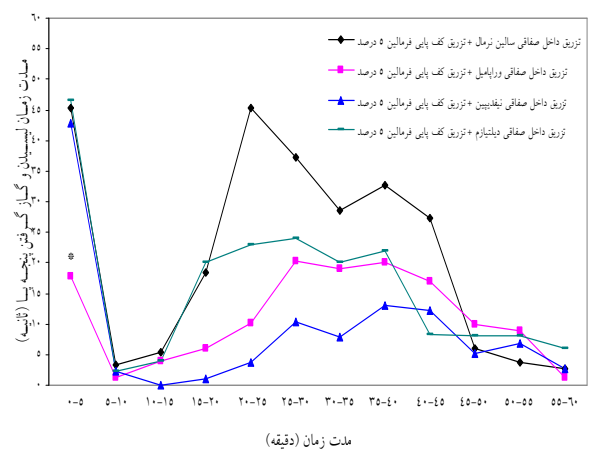


**نمودار ۱-** اثر وراپامیل بر رفتار درد (مدت زمان لیسیدن و گاز گرفتن پنجه پا) ناشی از فرمالین.  $p < 0.05$ \* در مقایسه با گروه دریافت کننده سالین نرمال به صورت داخل صفاقی.

تزریق سالیین نرمال می‌تواند ناشی از وارد شدن سر سوزن به زیر پوست باشد. علی‌رغم این‌که تزریق زیرپوستی در مطالعه حاضر با سر سوزن شماره ۲۸ انجام شده است ولی وارد شدن سر سوزن در هر شماره‌ای به بافت‌ها، به علت تحریک گیرنده‌های درد معمولاً با واکنش‌های درد همراه است (۱۴). در مطالعات قبلی نیز با تزریق سالیین نرمال با حجم ۲۰ میکرولیتر در کف پای موش‌های سوری واکنش‌های ضعیف درد در ۵ دقیقه اول پس از تزریق گزارش شده است (۱ و ۱۴).

در مطالعه حاضر پس از تزریق کف پای فرمالین ۵٪ با حجم ۲۰ میکرولیتر، واکنش‌های لیسیدن و گاز گرفتن پای تزریق شده در ۵ دقیقه‌های اول، چهارم، پنجم، ششم، هفتم، هشتم و نهم ایجاد می‌شود. با توجه به این‌که در این پنج دقیقه‌ها نسبت به زمان‌های دیگر واکنش‌های درد بسیار شدید بود، می‌توان نتیجه گرفت که درد به صورت دو مرحله‌ای (مرحله اول: ۰-۵ و مرحله دوم ۲۰-۴۵ دقیقه پس از تزریق) ظاهر می‌شود. در تحقیقات مربوط به درد برای ایجاد درد و بررسی واکنش‌های رفتاری، هورمونی، احشایی و الکتروفیزیولوژی درد، از مواد درازا مثل اسید استیک، برادی‌کینین، پروستاگلاندین‌ها، یون پتاسیم، هیستامین، سروتونین و نیکوتین استفاده شده است. در همین رابطه از فرمالین به طور گسترده‌ای استفاده شده و واکنش‌های رفتاری آن استاندارد و به تست فرمالینی معروف شده است (۱۴). در این تست غلظت‌های مختلف فرمالین از ۰/۱ تا ۵ درصد با حجم‌های متفاوت از ۱۰ تا ۵۰ میکرولیتر، در قسمت‌های مختلف بدن از جمله کف دست و پا، لب بالا، داخل صفاق و داخل کولون به منظور ایجاد و بررسی واکنش‌های رفتاری و هورمونی، دردهای پیکری و احشایی تزریق می‌شود (۳، ۸، ۱۱ و ۱۳). متعاقب تزریق فرمالین پاسخ‌های رفتاری مثل لیسیدن، گاز گرفتن، جویدن و بی‌حرکت نگه داشتن عضو تزریق شده به صورت دو مرحله‌ای 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

مقایسه اثر وراپامیل، نیفدیپین و دیلتیازم بر پاسخ درد نشان داد که بیشترین و کمترین اثر ضددردی در مرحله اول به ترتیب مربوط به وراپامیل و دیلتیازم است. در مرحله دوم درد بیشترین و کمترین اثر ضددردی به ترتیب مربوط به نیفدیپین و دیلتیازم می‌باشد. در مرحله اول درد اثر وراپامیل نسبت به سایر داروها معنی‌دار ( $p < 0.01$ )، ولی در مرحله دوم این اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد (نمودار ۴).



نمودار ۴- مقایسه اثر وراپامیل، نیفدیپین و دیلتیازم بر رفتار درد مرحله اول و دوم ناشی از تزریق کف پای فرمالین.  $p < 0.05$  در مقایسه با درد مرحله اول و داروی نیفدیپین و دیلتیازم. اختلاف معنی‌دار بین اثر این سه دارو در مرحله دوم درد وجود ندارد.

## بحث و نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که تزریق سالیین نرمال با حجم ۲۰ میکرولیتر در زیر پوست سطح داخلی (کف) پنجه پای موش‌های سوری، واکنش رفتاری بسیار خفیف فقط در ۵ دقیقه اول پس از تزریق ایجاد می‌کند. از تزریق سالیین نرمال در حجم‌های مختلف بسته به روش تحقیق به عنوان شاهد در اکثر مطالعات استفاده می‌شود و شاید مهم‌ترین دلیل استفاده از آن ایزوتونیک بودن محلول است که واکنش‌های مربوط به تونوسیت و فشار را در محل تزریق ایجاد نمی‌کند (۲ و ۸). احتمال ایجاد واکنش‌های ضعیف درد در پنج دقیقه اول پس از

مرحله دوم درد فرمالینی یک درد التهابی است و با دخالت انواع واسطه‌های التهابی مثل پروستاگلاندین‌ها، برادی کینین‌ها، هیستامین و آنزیم‌ها ایجاد می‌شود (۱۰ و ۱۴). با توجه به اینکه در مطالعه حاضر سه داروی وراپامیل، نیفدیپین و دیلتیازم پاسخ درد مرحله دوم را به‌طور معنی‌داری کاهش دادند، چنین می‌توان پیشنهاد کرد که مهار کننده‌های کانال‌های کلسیمی اثر مهاری بر آزاد سازی واسطه‌های التهابی دارند.

در مدل‌های مختلفی، اثرات ضددردی مهار کننده‌های کانال‌های کلسیمی را گزارش کرده‌اند. به‌طوری‌که Zbuzek و همکاران (۱۹۹۷) نشان دادند که نیفدیپین و وراپامیل دردهای ناشی از تست تلنجر دمی را کاهش می‌دهند. آن‌ها نیفدیپین را با دوز ۱۵ mg/kg و وراپامیل را با دوز ۱۰ mg/kg به‌صورت داخل صفاقی ۳۰ دقیقه قبل از تست تلنجر دمی تزریق کردند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که در این مدل نیفدیپین اثر ضد دردی بیشتری نسبت به وراپامیل دارد (۱۶). Martin و همکاران (۱۹۹۶) نشان دادند که نیفدیپین و نیمودیپین اثر ضد دردی در مدل تحریک الکتریکی دم (tail electric stimulation test) دارند. Martin و همکاران (۱۹۹۶) در آزمایش خود نیفدیپین و نیمودیپین را به‌مدت ۱۱ روز قبل از انجام آزمایش تحریک الکتریکی دم تزریق کردند. نتایج آزمایش آن‌ها نشان داد که نیفدیپین و نیمودیپین به‌صورت وابسته به دوز، درد ناشی از این تست را در موش‌های صحرائی کاهش می‌دهند (۷). Diaz و همکاران (۱۹۹۷) در مطالعه خود نشان دادند که مهار کانال‌های کلسیمی نوع P، N، L در نورون‌های شاخه پشتی نخاع، اثر مهاری در التهاب ناشی از تزریق زیر جلدی فرمالین دارد. آنها به‌صورت داخل نخاعی وراپامیل را با دوز ۵۰-۵۰ میکروگرم قبل از تزریق فرمالین تجویز کردند. از نوع N و از ω-Argatoxin-IVA به‌عنوان مهار کننده کانال کلسیمی نوع P استفاده کردند. برای ایجاد التهاب از فرمالین ۵ درصد با حجم ۵۰ میکرولیتر به‌صورت زیرجلدی استفاده شد

دقیقه پس از تزریق به مدت ۴۰-۳۰ دقیقه به‌صورت افزایش در رفتار (تحت عنوان درد التهابی) مشخص می‌شود. بین دو مرحله مذکور یک فاصله زمانی ۱۵-۵ دقیقه‌ای به‌صورت کاهش واکنش‌های درد وجود دارد (۸ و ۱۴). در مطالعه حاضر نیز برای ایجاد درد و بررسی واکنش‌های درد در موش‌های سوری از غلظت ۵ درصد فرمالین با حجم ۲۰ میکرولیتر استفاده شده است و همان‌طور که گفته شد استفاده از غلظت‌های مختلف فرمالین در کف پای موش‌های سوری درد ایجاد می‌کند (۱۴). از طرف دیگر واکنش‌های درد با اندازه‌گیری مدت زمان لیسیدن و گاز گرفتن پای مورد نظر ثبت شده که بر اساس تجربیات ذکر شده، این روش ثبت رفتار در موش‌های سوری، بهتر از روش نمره دادن می‌باشد (۸، ۱۰ و ۱۴). 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 مرحله‌ای بودن درد فرمالینی در مطالعه حاضر، هیچ‌گونه تضادی با گزارش‌های قبلی ندارد و به‌طور کامل آشکار می‌کند که فرمالین درد دو مرحله‌ای ایجاد می‌کند.

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که تزریق داخل صفاقی وراپامیل، نیفدیپین و دیلتیازم بر رفتار درد ناشی از فرمالین اثر مهاری دارد. به‌طوری‌که وراپامیل رفتار درد مرحله اول (۵-۰ دقیقه) و مرحله دوم (۴۵-۲۰ دقیقه) را کاهش می‌دهد ولی نیفدیپین و دیلتیازم فقط بر مرحله دوم درد اثر داشته و رفتار درد مرحله اول را کاهش نمی‌دهند. به‌طوری‌که قبلاً نیز توضیح داده شد مرحله اول درد ناشی از فرمالین یک درد نوروزئیک بوده و با تحریک مستقیم گیرنده‌های درد (نوسیسپتورها) ایجاد می‌شود و در این مرحله هیچ نوع واسطه شیمیایی شرکت نمی‌کند (۱۰ و ۱۴). در مطالعه حاضر از بین داروها فقط وراپامیل به‌طور معنی‌دار درد مرحله اول را کاهش داد و چنین می‌توان پیشنهاد کرد که این دارو اثر مستقیم ضد دردی دارد.

و نشان دادند که مهار کننده‌های کانال‌های کلسیمی اثرات متفاوتی بر پاسخ درد فرمالینی دارند و نوع کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ، در اثرات ضد دردی و ضد التهابی داروها نقش مهمی دارد (۳). Todorovic و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که تجویز مهار کننده‌های کانال‌های کلسیمی با دوز  $mg/kg$  ۳-۱۸ می‌تواند به صورت وابسته به دوز پاسخ درد را در موش‌های صحرائی کاهش دهد. آن‌ها برای ایجاد درد از تست صفحه داغ استفاده کرده و دوزهای مختلف وراپامیل اعم از ۳، ۶، ۹ و  $mg/kg$  ۱۸ را به صورت داخل صفاقی قبل از انجام آزمایش تزریق کردند (۱۵). Pathirathna و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه خود نشان دادند که آنتاگونیست‌های کانال‌های کلسیمی درد ناشی از گرما را در موش‌های صحرائی نژاد Sprague-Dawley مهار می‌کنند (۹). Shutov و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که نیمودیپین پاسخ درد نوروپاتی را در موش‌های صحرائی مبتلا به دیابت مهار می‌کند. هم‌چنین برای بررسی اثر نیمودیپین از تزریق فرمالین و تست گرما استفاده کردند. نتایج مطالعه آنها نشان داد که تجویز طولانی مدت نیمودیپین، پاسخ درد موش‌های دیابتیک را در تست فرمالین و گرما کاهش می‌دهد (۱۳).

همان‌طور که نتایج این تحقیق و مطالعات فوق نشان می‌دهد، برای مهار کننده‌های کانال‌های کلسیمی می‌توان اثر ضد دردی و ضد التهابی پیشنهاد نمود و نتایج این مطالعه نیز با نتایج

محققین مختلف همخوانی دارد. با توجه به این‌که کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ در کنترل عملکرد سلول‌های مختلف به‌خصوص نورون‌ها و آزاد شدن نوروترنسمیترها و مواد شیمیایی از سلول‌ها نقش مهمی دارند (۱۵) چنین می‌توان استنباط کرد که احتمالاً اثر ضد دردی در مرحله اول به‌دلیل بلوکه شدن کانال‌های کلسیمی از نوع L و کاهش پاسخ درد مرحله دوم، به‌دلیل مهار آزاد شدن واسطه‌های التهابی از سلول‌ها می‌باشد. علت تفاوت اثر ضد دردی سه داروی وراپامیل، نیفدیپین و دیلتیازم را شاید به‌توان به توانایی نفوذ داروها از سد خونی- مغزی و ظرفیت مسدود کردن کانال‌های کلسیمی توسط هر یک از داروها ربط داد.

به‌طور خلاصه این مطالعه نشان داد که وراپامیل، نیفدیپین و دیلتیازم رفتار درد ناشی از فرمالین را مهار کرده و اثر ضد دردی و ضد التهابی دارند. این اثرات را احتمالاً می‌توان به نقش کانال‌های کلسیمی در سلول‌های عصبی از یک طرف و آزاد شدن واسطه‌های التهابی از سلول‌ها ارتباط داد، ولی بررسی نقش دقیق مهار کننده‌های کانال‌های کلسیمی بر درد و التهاب در انسان و مدل‌های دیگر حیوانی، نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد.

## فهرست منابع

۱. تمدن‌فرد، ا. و مجتهدین، ع. (۱۳۸۳): اثر تزریق داخل صفاقی سایمتیدین بر پاسخ درد ناشی از فرمالین در موش‌های سوری، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۹، شماره ۴، صفحات: ۳۷۸-۳۷۳.
2. Choi, S.S., Lee, J.K. and 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.
3. Diaz, A. and Dickenson, A.H. (1997): Blockade of spinal N- and P-type, but not L-type, calcium channels inhibits the excitability of rat dorsal horn neurons produced by subcutaneous formalin inflammation. *Pain*, 69(1-2): 93-100.
4. Grossman, E. and Messerli, F.H. (2004): Calcium antagonists. *Prog. Cardiovas. Dis.*, 47(1): 34-57.
5. Hockerman, G.H., Peterson, B.Z., Johnson, B.D. and Catterall, W. (1997): Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 37: 361-396.



6. Kulak, W., Sobaniec, W., Wojtal, K. and Czuczwar, S.J. (2004): Calcium modulation in epilepsy. *Pol. J. Pharmacol.*, 56(1): 29-41.
7. Martin, M.I., Del Val V.L., Colado, M.I., Goicoechea, C. and Alfaro, M.J. (1996): Behavioral and analgesic effects induced by administration of nifedipine and nimodipine. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 55(1): 93-98.
8. Ness, T.J. (1999): Models of visceral nociception. *ILAR J*, 40(3): 119-128.
9. Pathirathna, S., Brimelow, B.C., Jagodic, M.M., Krishnan, K., Jiang, X., Zorumski, C.F., et al. (2005): New evidence that both T-type calcium channels and GABA<sub>A</sub> channels are responsible for the potent peripheral analgesic effects of 5-reduced neuro active steroids. *Pain*, 114(3): 429-443.
10. Porro, C.A. and Cavazzuti, M. (1993): Spatial and temporal aspects of spinal cord and brainstem activation in the formalin pain model. *Prog. Neurobiol.*, 41(5): 565-607.
11. Ren, K. and Dubner, R. (1999): Inflammatory models of pain and hyperalgesia. *ILARJ*, 40(3): 111-118.
12. Ryan, S.G. (1999): Ion channels and the genetic contribution to epilepsy. *J. Child Neurol.*, 14(1): 58-66.
13. Shutov, L., Kruglikov, I., Gryshchenko, O., Khomula, E., Viatchenko-Karpinski, V., Belan, P., et al. (2006): The effect of nimodipine on calcium homeostasis and pain sensitivity in diabetic rats. *Cell Mol. Neurobiol.*, 26(7-8): 1541-1557.
14. Tjolsen, A., Berge, O.G., Hunskaar, S., Rosland, J.H. and Hole, K. (1992): The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, 51(1): 5-17.
15. Todorovic, S.M., Pathirathna, S., Meyenburg, A. and Jevtovic-Todorovic, V. (2004): Mechanical and thermal anti-nociception in rats after systemic administration of verapamil. *Neurosci., Lett.*, 360(1-2): 57-60.
16. Zbuzek, V.K., Cohen, B. and Wu, W. (1997): Anti-nociceptive effect of nifedipine and verapamil tested on rats chronically exposed to nicotine and after its withdrawal. *Life Sci.*, 60(19): 1651-1658.

## **The effect of verapamil, nifedipine and diltiazem on formalin-induced pain response in mice**

**Khayat Nouri, M.H.<sup>1\*</sup>, Mahmody, J.<sup>2</sup>, Hoseinchi Ghareaghaji, M.R.<sup>3</sup>**

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

2-Graduate of Veterinary Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University-Science and Research Branch, Tehran, Iran

3-Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University-Urmia Branch, Urmia, Iran

\* *Corresponding author's email: mh.khayatnouri@iaut.ac.ir*

(Received: 2009/1/19, Accepted: 2009/8/23)

---

### **Abstract**

Voltage-gated calcium channels play a major role in the control of cellular processes in cardiac, vascular and neuronal tissues. Verapamil, nifedipine and diltiazem are calcium channel blockers widely used in the treatment of cardiovascular ailments in humans. A number of studies have shown that calcium channel blockers have antinociception and antiinflammatory effects in a range of animal models (but not in all animal models). The aim of this study was to investigate the effect of verapamil, nifedipine and diltiazem on formalin-induced pain and inflammation in mice. In this experimental study, verapamil, nifedipine and diltiazem (10 mg/kg) were intraperitoneally injected 30 minutes before the injection of 20µl of 5% formalin solution into the paw region. The time of licking and biting of injected paw was measured as pain response at 5 minute intervals for 1 hour. The results showed that formalin induced a biphasic pain response (first phase: 0–5 and second phase: 20–45 minute after injection). Intraperitoneal injection of verapamil, nifedipine and diltiazem before formalin reduced the second phase (inflammatory pain) of pain response significantly ( $p<0.05$ ) and only verapamil reduced the first phase (neurogenic pain) of pain response significantly ( $p<0.05$ ). Based on the results of this study it can be concluded that verapamil, nifedipine and diltiazem possess antinociceptive and antiinflammatory activity probably via a decrease in calcium influx that in turn interferes with the release of neurotransmitters and other substances that promote nociception and inflammation.

**Keywords:** Verapamil, Nifedipine, Diltiazem, Pain, Formalin, Mice