

# مهار خیز ناشی از سوختگی یا کاراگینین توسط تریفلوئوپرازین و تیودی فنیل آمید کلرايد در رت

علی خوش باطن<sup>\*\*(Ph.D.)</sup>محمد حاکساري<sup>\*(Ph.D.)</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف :** کالمودولین، یک پروتئین متصل شونده به کلسمیم است که بسیاری از اعمال داخل یاخته ای کلسمیم را واسطه گری می نماید. مهار کننده های کالمودولین که دارای اعمال ضد روان پریشی هستند، اعمال غیر مغزی آنها کمتر مطالعه شده است؛ بنابراین در پژوهش حاظر اثر ضد التهابی سه مهار کننده فنوتیازینی کالمودولین روی خیز التهابی ناشی از سوختگی یا کاراگینین بررسی شده و این اثرات با اثرات ضد التهابی ایبوپروفن مقایسه شد.

**مواد و روش ها :** این مطالعه مداخله ای - تحریبی روی رت های بالغ نر انجام شد. دو سری سوختگی درجه دو در پشت رت ها ایجاد شد و همچنین التهاب حاد پنجه توسط تزریق داخل کف پنجه ۱ میلی متر محلول کاراگینین ۵ mg/kg درصد ایجاد شد. تریفلوئوپرازین (TFP)، تیودی فنیل آمید کلرايد (TDPAC) و کلروفنوتیازین با دوزهای ۸ mg/kg و ۳۲ mg/kg ایبوپروفن با غلظت ۱۲ mg/kg به صورت i.p. و بعد از ایجاد سوختگی یا بعد از تزریق کاراگینین مصرف شدند. میزان خیز التهابی با اندازه گیری محتوای آب، مقدار رنگ آبی ایوانز (Evans Blue) خارج عروقی در بافت ملتہب و اندازه گیری تغییرات حجم پنجه تعیین گردید.

**نتایج :** تجویز دوز ۳۲ mg/kg TFP محتوای رنگ آبی ایوانز و همچنین محتوای آب را در پوست سوخته تحت درمان با این دارو در مقایسه با گروه کنترل (گروه سوخته درمان نشده) به طور معنی داری به میزان ۲۹ درصد کاهش داد، در حالی که دو داروی دیگر بی اثر بودند. اثر TFP روی محتوای رنگ یا نشت پروتئین در پوست سوخته قابل مقایسه با ایبوپروفن است؛ اگرچه، TFP، محتوای آب را در پوست سوخته به طور معنی داری به میزان ۲۲/۲ درصد بیشتر از ایبوپروفن مهار کرده است. TFP و TDPAC افزایش حجم پنجه ناشی از کاراگینین را به ترتیب به میزان ۳۸/۲ درصد و ۵۵/۳ درصد مهار نمودند. و همچنین TFP محتوای رنگ را در پنجه ملتہب به میزان ۴۵/۸ درصد مهار نمود. اثر ایبوپروفن بر روی مهار افزایش حجم پنجه بیشتر از اثر TFP بود ولی تفاوت معنی داری برای اثر مهاری این دو دارو روی کاهش رنگ آبی مشاهده نشد.

**استنتاج :** این نتایج پیشنهاد می کنند که مصرف مهار کننده کالمودولین (TFP) خیز التهابی حاد بعد از سوختگی و خیز ناشی از تزریق کاراگینین را کاهش می دهد، به طوری که اثر مهاری آن قابل مقایسه با اثر ایبوپروفن است.

**واژه های کلیدی :** سوختگی، کاراگینین، خیز التهابی، مهار کننده های کالمودولین، تریفلوئوپرازین

\* دانشیار گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی رفسنجان

✉ رفسنجان- میدان انقلاب- دانشکده پزشکی رفسنجان- گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی

\*\* استادیار گروه فیزیولوژی و فیزیک پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیه...

## مقدمه

اگرچه سازوکار داخل یاخته‌ای عمل کلسیم به تازگی شناخته شده است، یک مسیر برای عمل کلسیم از طریق یک گروه از پروتئین‌های متصل شونده به کلسیم مطرح شده است که مستقیماً آنزیم‌های داخل یاخته‌ها رافعال می‌کنند. کالمودولین یک پروتئین متصل شونده به کلسیم است که به فراوانی در داخل یاخته‌ها وجود دارد و در سال ۱۹۷۰ توسط کالیوچی و یاماکی (Yamazaki ، Kakiuchi ) کشف شد<sup>(۱)</sup>. این پروتئین بعد از اتصال به کلسیم توانایی دارد که تعداد زیادی از آنزیم‌ها را در *in vitro* فعال کند. مجموعه کلسیم-کالمودولین می‌تواند پروتئین کینازهای معینی را فعال کند که منجر به فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون آنزیم‌ها شده و فعالیت آنزیم‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. همچنین ابتدا نشان داده شده که این مجموعه فعال کننده فسفودی استراز است<sup>(۲)</sup>. با توجه به بیان فوق که کالمودولین بسیاری از اعمال وابسته به کلسیم را در انواعی از یاخته‌ها واسطه می‌نماید، بنابراین، یکی از راه‌های آزمودن فرضیه نقش کلسیم در التهاب، مهار کالمودولین توسط مهار کننده‌ها یا آنتاگونیست‌های کالمودولین است. از سوی دیگر گزارش شده است که مهار کننده‌های کالمودولین توانایی مهار  $PLA_2$  و تولید پروستاگلاندین‌ها<sup>(۳)</sup>، مهار PLC<sup>(۴)</sup>، مهار آنزیم‌های مختلف دیگر<sup>(۵)</sup>، مهار آنزیم‌های مختلف دیگر<sup>(۶)</sup> و همچنین ترمیم زخم سوختگی را دارا هستند، که همه این اثرات تأکیدی بر نقش فیزیولوژیک بیشتر برای کالمودولین و مؤثر بودن احتمالی مهار کننده‌های کالمودولین در درمان التهاب حاد است.

اولین بار در سال ۱۹۷۶، لوین و وايس (Levin ، Weiss ) مطح نمودند که داروهای نورولپتیک به

تجمع موضعی مایع یا خیز یکی از ویژگی‌های بارز التهاب حاد است و از سوی دیگر در بیماری‌های التهابی از قبیل ورم مقاصل، آسم، و کهیر، پیدایش خیز بافتی تعیین کننده است، به طوری که داروهای ممانعت کننده تشکیل خیز بافتی، دارای توان درمانی در التهاب می‌باشند<sup>(۱)</sup>. همچنین تشکیل خیز در بافت‌های خیلی نرم در بعد از سوختگی رخ می‌دهد و اگر این خیز شدید باشد، ببهودی زخم بعد از سوختگی را دچار اختلال می‌کند و کمک به تبدیل جراحت‌سوختگی با ضخامت نسبی به جراحت سوختگی با ضخامت کامل می‌نماید<sup>(۲)</sup>. اگرچه فرآیند تشکیل خیز درظرف ۶۰ سال گذشته به میزان زیادی مطالعه شده است، اما راجع به پاتولوژی و سازوکارهای تشکیل خیز خصوصاً خیز سوختگی اطلاعات اندکی در دسترس است؛ اگرچه این موضوع مورد قبول همه است که اکثر جنبه‌های التهاب حاد (مانند التهاب بعد از سوختگی و التهاب ناشی از کاراگینین) از طریق رهایش میانجی‌های مختلف التهابی از قبیل هیستامین، سروتونین، برادی کینین، سیتوکین‌ها، کمپلمان‌ها، ایکوزانوئیدها، ماده P ، NO ، و CGRP از بافت‌های میزان رها می‌شوند و وجود این میانجی‌ها برای فرآیند التهاب حاد ضروری است<sup>(۳)</sup>.

حرکت کلسیم، احتمالاً یک عامل مهم درفعال شدن یاخته‌های دخیل در التهاب است. کلسیم این عمل خود را یا از طریق رهایش دانه‌های ترشحی از یاخته‌های تیرکدار و سایر یاخته‌های دخیل در التهاب اعمال می‌کند<sup>(۴)</sup>؛ یا از طریق فعال کردن آنزیم‌های داخل یاخته‌ای<sup>(۵)</sup> و یا به عنوان واسطه برای ایجاد اثرات میانجی‌های التهابی و پیدایش پاسخ برای ترکیبات فوق عمل می‌نماید. با توجه به شواهد فوق فرض می‌شود که کلسیم در پیدایش التهاب یا خیز بافتی نقش دارد.

آلبینوان ماری با وزن ۱۶۰ تا ۱۸۰ گرم انجام گرفت. رتها در قفسهای ۵تایی در حیوانخانه دانشکده پزشکی رفسنجان، با درجه حرارت ۲۰ تا ۲۲ درجه سانتیگراد و سیکل روشنایی - تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند، آب و غذا آزادانه در اختیار آنها بود.

**روش ایجاد سوختگی:** ابتدا حیوانها وزن شده و سپس با تزریق داخل صفاتی (i.p.) تیوپنتال سدیم به میزان  $40 \text{ mg/kg}$  بیهوش شدند. پس از کوتاه کردن موهای پشت آنها، با استفاده از یک فلز آهنی با سطح ۴ سانتی‌متر مربع که تا  $105$  درجه سانتیگراد توسط یک heater گرم شده بود و برای مدت دو ثانیه با سطح پوست تماس داده شد، سوختگی ایجاد گردید. این روش ایجاد سوختگی تقریباً مشابه روش الکساندر (Alexander) (۲۰) است. با این فلز آهنی دو سری سوختگی تجربی درجه دو در طرف چپ ستون مهره‌های حیوان و با فاصله دو سانتی‌متری از آن ایجاد شد. بعد از ایجاد سوختگی به حیوانها سالین تزریق شد. سوختگی‌ها به حد کافی کوچک بودند تا پاسخ سیستمیک ایجاد نکنند (۲۱). از آنجایی که مطالعه قبلی ما (۲۱) و همچنین گزارش پژوهشگران دیگر (۲۲) حاکی از حداقل خیز یا التهاب ایجادی در ساعت سوم بعد از سوختگی است؛ بنابراین در ساعت سوم بعد از القاء (تقریباً ۲ سانتی‌متر مربع) از جایگاه‌های سوخته برش داده شد و جهت انجام آزمایش‌های مربوط به نفوذ پذیری و همچنین مطالعات بافت شناسی مورد استفاده قرار گرفتند.

**روش ایجاد التهاب پنجه:** ابتدا حیوانها وزن شده و سپس با تزریق داخل صفاتی (i.p.) تیوپنتال سدیم به میزان  $40 \text{ mg/kg}$  بیهوش شدند. خیز التهابی در پنجه موش‌ها با تزریق  $0.1 / 0.5$  میلی‌لیتر از محلول  $0.5\%$  درصد کاراگینین (Sigma Co.Uk) به داخل کف پای چپ

کالمودولین متصل شده و فعالیت آن را مهار می‌کنند (۱۸). این مشاهدات منجر به انجام تحقیقات روی عمل کالمودولین در سیستم‌های سلولی ایزوله در *in vitro* گردید. در حال حاضر یک حجم رویه رشد از مشاهدات معروف این است که داروهای ضد روان‌پریشی (ضدجنون) و فتویازینی عمل کالمودولین را در بسیاری از مسیرهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مختلف مهار می‌کنند (۱۵، ۹، ۸). تری‌فلوئوپرازین (TFP) یکی از همین داروهای است که بعد از تشکیل کمپلکس با کالمودولین، باعث ناتوانی مجموعه کلسیم-کالمودولین می‌شود (۱۵، ۱۲، ۱۱، ۱۰، ۸). در مطالعات دیگر، نقش مهار کنندگی ترکیبات فتویازینی دیگر از قبیل تیودی‌فنیل آمد کلرید (TDPAC) و ۲-کلروفتویازین (CPT) نیز مشخص شد (۱۹، ۱۵). از آنجایی که بعضی از اعمال داروهای فتویازینی در *In vitro*، بیانگر نقش آنها مهار کالمودولین در *in vitro*، می‌باشد و همچنین از طرف دیگر، اگرچه امروزه راه‌های درمانی مختلفی برای کنترل خیز التهابی اعمال می‌شود، اما هیچ کدام به درمان کامل و قطعی بیماری منتهی نگرددیده است؛ بنابراین برای پژوهش راجع به اثر احتمالی بعضی از مهار کنندگاهای کالمودولین روی خیز التهابی، ما اثر سه داروی فوق (CPT, TDPAC, TEP) را روی خیز ناشی از سوختگی و خیزناشی از تزریق کاراگینین در موش صحرایی مورد آزمون قرار دادیم، که شاید اولاً به طور مستقیم نقش مجموعه کلسیم-کالمودولین را در خیز التهابی نشان دهیم، ثانیاً کاربرد فارماکولوژیک جدیدی برای این داروها مطرح نماییم و ثالثاً کمکی به درمان سوختگی و درمان بیماری‌های التهابی کرده باشیم.

**مواد و روش‌ها**  
حیوان‌ها : این مطالعه مداخله‌ای-  
تجربی دوسوکور روی رت (rat) بالغ از جنس نر از نژاد

مهرار کننده‌های فوق با دوزهای  $8 \text{ mg/ml}$  و  $8 \text{ mg/kg}$  و  $32 \text{ mg/ml}$  و  $32 \text{ mg/kg}$  (Ibuprofen Sigma Co.Uk) به میزان  $12 \text{ mg/kg}$  (Ibuprofen Sigma Co.Uk) به صورت داخل صفاقی (i.p.) بعد از  $12 \text{ mg/ml}$  به صورت داخل صفاقی (i.p.) بعد از ایجاد سوختگی و همچنین بعد از تزریق کاراگینین مورد استفاده قرار گرفتند. محلول تمامی داروهای فوق در سرم فیزیولوژیک تهیه شده، به جزء TDPAC و ایبوپروفن که در الکل تهیه شدند. همچنین همه داروها بلافالسله قبل از استفاده آماده می‌شدند.

**روش آماری:** اطلاعات به دست آمده توسط آزمون‌های آنالیز واریانس یک طرفه و به دنبال آن استفاده از آزمون Tukey و در برخی از موارد با استفاده از آزمون unpaired t-test تجزیه و تحلیل Mean  $\pm$  SEM شدند. نتایج همه آزمایش‌ها به صورت  $P < 0.05$  اختلاف معنی‌دار منظور گزارش شد و با طرح  $\text{P} < 0.05$  اختلاف معنی‌دار منظور گردید.

## نتایج

بررسی بافت شناسی نشان داد که سوختگی ایجاد شده باعث تخریب اپیدرم و قسمت سطحی درم شده است، یعنی سوختگی درجه دو سطحی توسط این روش ایجاد شده است.

اثر مهرار کننده‌های کالمودولین بر روی محتوای رنگ در پوست سوخته در نومادر شماره ۱ مشاهده می‌شود محتوای رنگ آبی ایوانز در پوست سوخته درمان نشده ( $21/2 \pm 2/1$ ) به طور معنی داری بیشتر از پوست سالم ( $1/7 \pm 0/1$ ) است ( $P < 0.001$ ). همچنین مهرار کننده‌های کالمودولین (CPT) و تیودی فنیل آمید کلرايد (TDPAC) که با دوز  $\text{mg/kg}$  و به طریق داخل صفاقی پس از سوختگی مصرف شده‌اند، محتوای رنگ آبی را در مقایسه با پوست سوخته

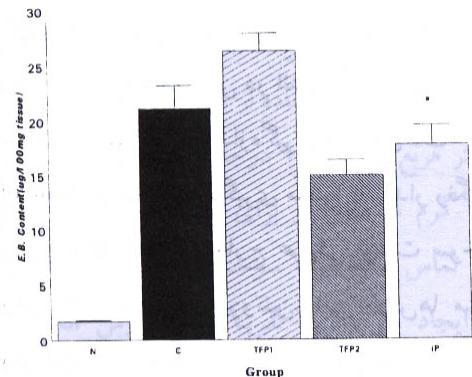
حیوان ایجاد شد و به پای راست حیوان، همین حجم ( $1/1$  میلی لیتر) سرم فیزیولوژیک تزریق گردید ( $24,23$ ). کاراگینین، یک پاسخ التهابی حاد مشابه با آنچه که در آسیب‌های مفاصل انسانی رخ می‌دهد (همراه با مهاجرت دائم گلبول‌های سفید به محل التهاب است) ایجاد می‌کند ( $24$ ).

روش اندازه‌گیری خیز یا التهاب ناشی از سوختگی: برای بررسی تغییرات در نفوذپذیری عروق از دو روش ساده، اما معتبر ( $25$ ) و کمی در اندازه‌گیری خیز سوختگی استفاده کردیم: الف- اندازه‌گیری محتوای آب (water content)، و ب- اندازه‌گیری محتوا یا مقدار رنگ آبی ایوانز (Evans blue) خارج عروقی پوست سوخته، یا روش نشان‌دار کردن بروتئین. این روش‌ها مشابه با روش‌های مورد استفاده در مطالعه قبلی ما است ( $21$ ).

روش اندازه‌گیری التهاب پنجه: میزان التهاب پنجه به وسیله دو روش اندازه‌گیری شد: الف- روش پلتیسموگرافی مایع، که در این روش، در ساعت چهارم بعد از تزریق کاراگینین (که حداقل خیز ایجاد می‌شود) حجم پنجه‌های راست و چپ که به آن کاراگینین تزریق شده بود از حجم پنجه راست که به آن سرم فیزیولوژیک تزریق شده بود، کسر گردید و افزایش حجم (ml) پنجه چپ معادل با ایجاد خیز التهابی به وسیله کاراگینین در نظر گرفته شد ( $27,26$ ). ب- روش نشان‌دار کردن بروتئین، که این روش با روش ب اندازه‌گیری خیز سوختگی مشابه است. اندازه‌گیری‌ها در ساعت معین و توسط فرد مشخصی انجام شد.

**داروها:** داروهای زیر مورد استفاده قرار گرفتند: الف- مهرار کننده‌های کالمودولین: ۱. تری‌فلوئوپرازین (TFP), Sigma [Trifluoprazine (TFP), Sigma Co.Uk] ، ۲. تیودی فنیل آمید کلرايد [Thiodiphenylamine chloride (TDPAC), Sigma Co.Uk] ، ۳. ۲- کلروفنوتیازین (CPT), Sigma [2-Chlorophenothiazine (CPT), Sigma Co.Uk]

ایبوپروفن (۱۲ mg/kg) محتوای رنگ آبی را به میزان ۱۷/۴ درصد در مقایسه با پوست سوخته درمان نشده (کنترل) کاهش داد (نمودار شماره ۲). محتوای رنگ آبی ایوانز در گروه ایبوپروفن ( $17/5 \pm 1/3$ ) به طور معنی داری کمتر از اثر دوز اندک TFP ( $26/7 \pm 1/3$ ) است ( $P < 0.05$ ), در حالی که اختلاف معنی داری بین ایبوپروفن و اثر دوز زیاد TFP ( $15 \pm 1/4$ ) وجود ندارد.

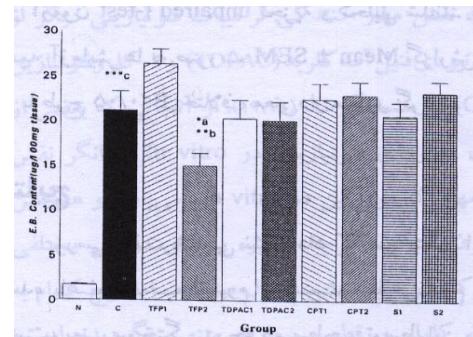


نمودار شماره ۲: مقایسه اثر تری فلوئوپرازین با اثر ایبوپروفن بر روی محتوای رنگ آبی ایوانز (E.B.) در پوست سوخته و مقایسه آنها با پوست سوخته درمان نشده (C). N: گروه سالم، TFP: تری فلوئوپرازین با دوز  $32 \text{ mg/kg}$ , TFP<sub>2</sub>:  $15 \text{ mg/kg}$ , IP:  $32 \text{ mg/kg}$ . ایبوپروفن\*: اختلاف معنی دار ایبوپروفن را با TFP<sub>1</sub> و کنترل با IP نشان می دهد.  $P < 0.05$ .

آخر مهارکننده های کالمودولین بر روی محتوای آب در پوست سوخته درمان نشده (کنترل) به مقایسه آنها با اثر ایبوپروفن در نمودار شماره ۳ مشاهده می شود که میزان محتوای آب در پوست سوخته درمان نشده (کنترل) به میزان  $30/4$  درصد بیشتر از این میزان در پوست سالم یا طبیعی است ( $P < 0.05$ ). تجویز داخل صفاتی  $\text{mg/kg}$   $32 \text{ mg/kg}$  تری فلوئوپرازین (TFP) محتوای آب را به میزان ۲۹ درصد در مقایسه با پوست سوخته درمان نشده کاهش داده است ( $P < 0.01$ ). همچنین اختلاف معنی داری بین

درمان نشده یا کنترل کاهش نمی دهند؛ اگر چه در ظاهر افزایش در محتوای رنگ برای TFP ( $26/7 \pm 1/3$ ) در مقایسه با کنترل ( $21/2 \pm 2/1$ ) مشاهده می شود ولی این تفاوت معنی دار نیست.

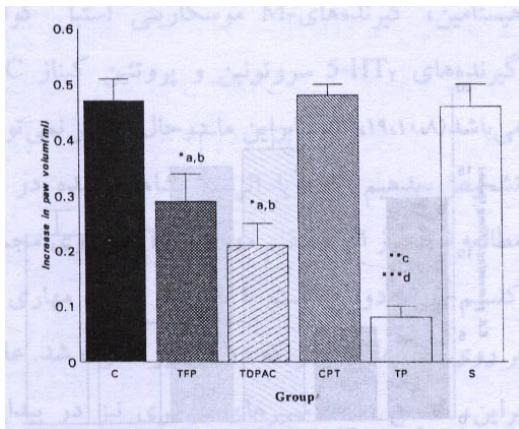
همچنین TFP با دوز  $32 \text{ mg/kg}$  محتوای رنگ را به میزان ۲۹ درصد در مقایسه با پوست سوخته درمان نشده (کنترل) کاهش می دهد ( $P < 0.05$ ) و همچنین به میزان  $35/6$  درصد در مقایسه با گروه Sham (حلال) میزان رنگ را کاهش داده است ( $P < 0.01$ ). علاوه بر این اختلاف معنی داری بین دوز  $32 \text{ mg/kg}$  و سایر مهارکننده های کالمودولین وجود دارد ( $P < 0.01$ ). برای ایجاد این پاسخ دو آنتاگونیست دیگر کالمودولین بی اثر بودند.



نمودار شماره ۱: نمایش اثر مهارکننده های مختلف کالمودولین بر روی محتوای رنگ آبی ایوانز (E.B.) در پوست سوخته و مقایسه آنها با پوست سوخته درمان نشده (C). N: گروه سالم، TFP:  $32 \text{ mg/kg}$ , TDPAC<sub>1</sub> و TDPAC<sub>2</sub>: گروه های تیودی فیل آمید کلراید به ترتیب با دوز های  $8$  و  $32$  میلی گرم. CPT<sub>1</sub> و CPT<sub>2</sub>: گروه های  $-2$ -کلروفنتیازین به ترتیب با دوز های  $8$  و  $32 \text{ mg/kg}$ . S<sub>1</sub>: حلال TDPAC. S<sub>2</sub>: حلال TFP. a: اختلاف معنی دار TFP<sub>2</sub> را با گروه های دیگر و همچنین می دهد. b: اختلاف معنی دار TFP<sub>1</sub> را با گروه های دیگر و همچنین با S<sub>1</sub> نشان می دهد. c: اختلاف معنی دار کنترل را با گروه سالم نشان می دهد. \*\*\*P < 0.001, \*\*P < 0.01, \*P < 0.05.

مقایسه اثر TFP با ایبوپروفن بر روی محتوای رنگ در پوست سوخته

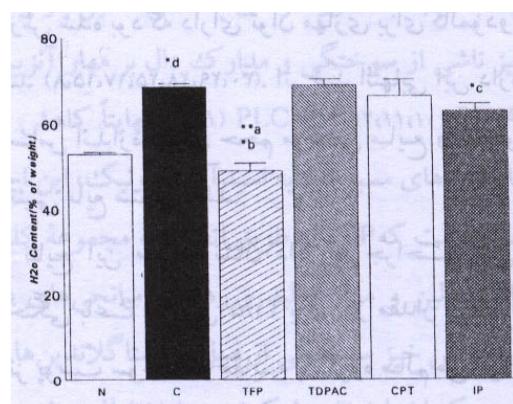
مقایسه اثر مهارکننده های کالمودولین بر روی افزایش حجم پنجه ناشی از کاراگینین در نمودار شماره ۴، مشاهده می شود که تزریق کاراگینین حجم پنجه را به میزان  $0.047 \pm 0.01$  در گروه کنترل افزایش داده است. این افزایش حجم به ترتیب به میزان  $0.238 \pm 0.055$  درصد و  $0.32 \pm 0.05$  درصد توسط دوز  $32 \text{ mg/kg}$  تری فلوئورپرازین (TFP) و  $12 \text{ mg/kg}$  تیودی فنیل آمید کلراید (TDPAC) مهار شده است ( $P < 0.05$ ). ۲- کلروفنتوتیازین (TDPAC) اثری بر روی افزایش حجم پنجه ناشی از تزریق کاراگینین نداشت. تجویز ایبوپروفن ( $12 \text{ mg/kg}$ ) افزایش حجم پنجه ناشی از تزریق کاراگینین را به میزان  $0.083 \pm 0.01$  درصد مهار نموده است که این اثر مهاری دارای اختلاف معنی دار با اثر مهاری TFP و TDPAC ( $P < 0.01$ ) است و همچنین در مقایسه با گروه کنترل و sham ( $P < 0.01$ ) می باشد و در مقایسه با گروه کنترل و sham (حلال) و گروه کلروفنتوتیازین افزایش حجم پنجه را کاهش داده است ( $P < 0.001$ ).



نمودار شماره ۴: مقایسه اثر مهارکننده های مختلف کالمودولین با اثرباره ایبوپروفن بر روی افزایش حجم پنجه ناشی از تزریق کاراگینین. C: گروه کاراگینین، TFP: گروه تری فلوئورپرازین، TDPAC: گروه تیودی فنیل آمید، CPT: گروه کلروفنتوتیازین، IP: ایبوپروفن، a,b: اختلاف معنی دار TFP و TDPAC و CPT با گروه های sham، c,d: اختلاف معنی دار ایبوپروفن را با گروه های کاراگینین، کنترل و sham نشان می دهد. C: اختلاف معنی دار ایبوپروفن را با گروه های TFP و TDPAC و CPT و IP.

اثر TFP با سایر مهارکننده های کالمودولین (کلروفنتوتیازین و تیودی فنیل آمید) وجود دارد ( $P < 0.05$ ). بدین معنی که TFP محتوای آب را کاهش داده است، در حالی که سایر مهارکننده های کالمودولین بی اثر می باشند. علاوه بر این بین Sham (حلال) و TFP اختلاف معنی دار وجود دارد ( $P < 0.01$ ).

ایبوپروفن [i.p.]  $12 \text{ mg/kg}$  محتوای آب در پوست سوخته را به میزان  $0.087 \pm 0.008$  درصد در مقایسه با پوست سوخته درمان نشده (کنترل) کاهش داد. محتوای آب در گروه TFP (تری فلوئورپرازین) با غلظت  $32 \text{ mg/kg}$  به میزان  $0.049 \pm 0.004$  است، که به طور معنی داری کمتر از محتوای آب در گروه ایبوپروفن ( $0.017 \pm 0.003$ ) است و بین آنها اختلاف معنی دار وجود دارد ( $P < 0.05$ )؛ یعنی این که TFP به میزان  $0.022 \pm 0.002$  درصد محتوای آب در پوست سوخته را بیشتر از ایبوپروفن مهار کرده است.



نمودار شماره ۵: نمایش اثر مهارکننده های مختلف کالمودولین بر روی محتوای آب در پوست سوخته و مقایسه آنها با پوست سوخته درمان نشده (C). هر یک از مهارکننده ها به میزان  $32 \text{ mg/kg}$  تزریق شده اند. N: گروه سالم، TFP: گروه تری فلوئورپرازین، TDPAC: گروه تیودی فنیل آمید کلراید، CPT: گروه کلروفنتوتیازین، IP: ایبوپروفن، a: اختلاف معنی دار TDPAC و کنترل نشان می دهد. b: اختلاف معنی دار TFP را با ایبوپروفن نشان می دهد. c: اختلاف معنی دار ایبوپروفن را با کنترل نشان می دهد. d: اختلاف معنی دار کنترل را با گروه سالم نشان می دهد.  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ .

با گروه‌های کاراگینین، Sham و CPT نشان می‌دهد. C: اختلاف معنی‌دار \*\*\*P<0.001، \*\*P<0.01

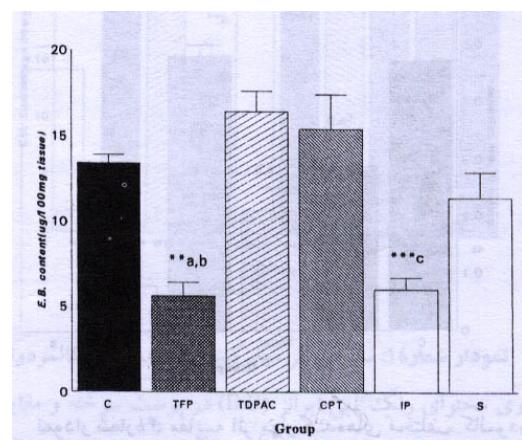
\*\*P<0.001، \*P<0.01

## بحث

مشخص شده است که داروهای ممانعت کننده تشکیل خیز بافتی در التهاب حاد، دارای توان درمانی هستند<sup>(۱)</sup>. همچنین اگر خیز در بعد از سوختگی شدید باشد و درمان نشود، بهبودی زخم سوختگی را به تأخیر می‌اندازد<sup>(۲)</sup>. تصور بر این است که کلسیم در پیدایش خیز التهابی نقش دارد<sup>(۳،۴،۵)</sup> و کالمودولین اعمال داخل یاخته‌ای کلسیم را واسطه‌گری می‌نماید<sup>(۶،۷،۸)</sup>. مصرف داروهای فوتیازینی در *in vitro* باعث مهار مجموعه کلسیم- کالمودولین می‌شوند<sup>(۹،۱۰،۱۱)</sup>. بنابراین، این احتمال وجود دارد که مصرف آنها در *in vitro* موجب مهار خیز ناشی از کاراگینین گردد، لذا به منظور تعیین نقش کالمودولین در خیز بافتی در پژوهش حاضر دوزهایی از داروهای مهارکننده‌های فوتیازینی کالمودولین استفاده شد که در *in vitro* و *in vivo* گزارش شده بود که دارای توان مهاری برای کالمودولین هستند<sup>(۱۰،۱۱،۱۲،۱۳،۱۴)</sup>. اثر ضد التهابی این داروها براساس اندازه‌گیری حجم موضعی مایع و محتوای پروتئینی مایع سنجیده شد.

نتایج این مطالعه نشان داد که جراحت ناشی از سوختگی باعث افزایش ۱۱/۵ برابر در مقدار رنگ آبی ایوانز پوست سوخته در مقایسه با گروه سالم می‌شود، به عبارت دیگر سوختگی نشت پروتئین را از عروق ۱۱/۵ برابر افزایش داده است. دوز اندک سه داروی فوتیازینی مصرف شده (TFP، TDPAC و CPT)، بر روی کاهش این نشت پروتئین افزایش یافته ناشی از سوختگی بی‌اثر هست؛ تجویز دوز زیاد این مهار کننده‌های کالمودولین نشان داد که فقط TFP مؤثر است، به طوری که بعد از سوختگی مقدار رنگ آبی

مقایسه اثر مهارکننده‌های کالمودولین بر روی محتوای رنگ پنجه ناشی از کاراگینین محتوای رنگ آبی ایوانز در پنجه ملتهب در اثر تزریق کاراگینین به میزان  $13/4 \pm 0/5$  است (نمودار شماره ۵). در اثر تجویز داخل صفاقی ۲۲ mg/kg تری‌فلوئوپرازین (TFP) محتوای رنگ آبی ایوانز در پنجه ملتهب کاهش یافته و به میزان  $5/6 \pm 0/8$  می‌رسد که دارای اثر معنی‌دار با گروه کنترل (گروه تزریق کاراگینین) و Sham (حلال) است ( $P<0.01$ ). ایوبروفن (۱۲ mg/kg) نیز محتوای رنگ آبی را به میزان  $55/2$  درصد در پنجه ملتهب در مقایسه با گروه کنترل مهار نموده است ( $P<0.001$ )، که این اثر مهاری اخلاف معنی‌داری با اثر مهاری TFP ندارد، اگر چه دارای اختلاف معنی‌داری با سایر مهارکننده‌های کالمودولین [تیودی فنیل آمید (TDPAC) و ۲-کلروفوتیازین (CPT)] و گروه Sham (حلال) است ( $P<0.001$ ).



نمودار شماره ۵: مقایسه اثر مهارکننده‌های مختلف کالمودولین با اثر ایوبروفن بر روی محتوای رنگ آبی ایوانز (E.B.) پنجه ناشی از تزریق کاراگینین. C: گروه کاراگینین، TFP: گروه تری‌فلوئوپرازین، TDPAC: گروه تیودی فنیل آمید، CPT: گروه کلروفوتیازین، IP: گروه ایوبروفن، S: گروه Sham. a,b: اختلاف معنی‌دار TFP را با

گلیکولیز در پوست آسیب دیده جلوگیری می‌کنند (۲۸،۱۹،۱۷،۱۶)، لذا، این احتمال نیز قابل طرح است که شاید TFP از طریق کاهش پروستاگلاندین‌ها و افزایش تولید ATP، تثبیت غشاء یاخته را موجب شده که نتیجه این ثبیت، کاهش جراحت بافتی و عروقی و کاهش التهاب است. از آنجایی که مشخص شده است مهار کننده‌های کالمودولین فعالیت آنزیم فسفودی استراز مربوط به cAMP را مهار و نتیجتاً افزایش cAMP را موجب می‌شوند (۸،۱۵،۱۴،۱۰). شاید TFP از طریق افزایش cAMP در یاخته درون پوش وریدچه‌ها، شل شدن این یاخته‌ها و کاهش شکاف بین این یاخته‌ها را موجب شده است (۲۱) و از این طریق خیزبافتی را کاهش داده است. دلیل احتمالی دیگر اثر مهاری TFP روی التهاب، تعدیل پاسخ ایمنی توسط این دارو است (۱۳،۳۱).

TFP شاید از طریق مهار رهایش میانجی‌های دیگر دخیل در تشکیل خیز التهابی از قبیل سروتونین (۱۳) یا برادی‌کینین (۱۷) خیز سوختگی را مهار نموده است.

علی‌رغم دلایل احتمالی فوق، از آنجایی که TFP نه فقط مهار کننده کالمودولین است، بلکه دارای اثرهای بر روی گیرنده‌های  $D_2$  دوپامین، گیرنده‌های  $H_1$  هیستامین، گیرنده‌های  $M_3$  موسکارینی استیل کولین، گیرنده‌های ۵-HT<sub>2</sub> سروتونین و پروتئین کیناز C نیز می‌باشد (۳۲،۱۹،۱۰،۸). بنابراین ما در حال حاضر نمی‌توانیم تشخیص بدھیم که آیا اثرات مشاهده شده در این مطالعه ناشی از اثر مستقیم مهاری TFP بر روی مجموع کلسیم-کالمودولین است یا ناشی از اثرات مهاری آن بر روی مسیرهای دیگر که در فوق بر شمرده شد. علاوه بر این، ممکن است مسیرهای دیگری نیز در پیدایش اثرات TFP دخالت داشته باشند. در هر مورد آن جالب خواهد بود تا در پژوهش‌های آینده با استفاده از مهار کننده‌های اختصاصی تر کالمودولین و همچنین مصرف مهار کننده‌های اختصاصی گیرنده‌های فوق، مکانیسم

ایوانز را در بافت سوخته در مقایسه با کنترل به میزان ۲۹ درصد کاهش داد و اثر مهاری TFP دارای اختلاف معنی‌داری با اثرات TDPAC و CPT است. نتایج حاصل از بخش دیگر این پژوهش بیانگر این است که سوختگی باعث افزایش  $30/4$  درصدی در محتوای آب پوست سوخته در مقایسه با گروه سالم می‌شود. TFP در دوز زیاد به میزان ۲۹ درصد افزایش در محتوای آب پوست سوخته را نیز مهار نموده است، در حالی که دو داروی دیگر فتوتیازینی معرف این است که فعل شدن کالمودولین در بافت سوخته در پیدایش خیز نقش دارد. نتایج حاصل از این مطالعه، با نتایج مطالعات پژوهشگران دیگر که نشان داده‌اند، مؤثرترین مهار کننده کالمودولین است (۱۹،۱۷،۱۶،۸)، موافق می‌باشد و همچنین با گزارش بایتر (Beitner) که اعلام نمود TFP در درمان آسیب‌های پوستی ناشی از سوختگی (۱۶) و سرمادزگی (۱۷) مؤثر است، مطابقت دارد. با توجه به مطالعه حاضر می‌توان پیشنهاد نمود که اثر TFP روی تسریع درمان سوختگی که بایتر گزارش نموده است، شاید از طریق کاهش خیز سوختگی باشد.

با توجه به سازوکارهای احتمالی دخیل در پیدایش خیز ناشی از سوختگی و مدارک دال بر مهار آنزیم‌های  $PLC_2$  (۱۳،۱۲،۱۱،۱۰)،  $PILA_2$  (۱۱) و نهایتاً کاهش تولید متabolیت‌های مسیر تجزیه اسید‌آرشیدونیک، این احتمال مطرح است که TFP از طریق اتصال به مجموعه کلسیم-کالمودولین و مهار تولید و رهایش میانجی‌های دخیل در پیدایش خیز سوختگی از قبیل پروستاگلاندین‌ها (۱۲)، ترومبوکسان‌ها (۲۰) و لوکوترین‌ها (۲۱) اثر مهاری خود را اعمال نموده است. همچنین از آنجایی که گزارش شده است مجموع کلسیم-کالمودولین آسیب به غشاء یاخته را واسطه‌گری می‌نمایند و از سوی دیگر گزارش شده است که آنتاگونیست‌های کالمودولین از کاهش ATP و کاهش فعالیت بعضی از آنزیم‌های مسیر

این که کالمودولین هم در رهایش میانجی های عصبی از انتهای اعصاب(۱۲،۳۰،۳۶) و هم در رهایش هورمون ها از غدد درون ریز(۱۳،۳۷) دخالت می کند، لذا شاید گوناگونی سازو کارهای ایجادی در دو نوع التهاب، بیانگر پاسخ متفاوت مهاری به TFP و TDPAC در این دو آزمایش باشد.

همچنین دلیل مشاهده اثر TDPAC و حتی بیشتر بودن اثر آن از TFP در این نوع التهاب شاید این باشد که نقش کالمودولین در این نوع التهاب بیشتر از خیز سوختگی می باشد، زیرا گزارش شده است که اثر مهار کنندگی TDPAC روی کالمودولین و فعالیت آنزیمی وابسته به کالمودولین، بیشتر از TFP است(۱۵). اثر ضد التهابی مشاهده شده در این مطالعه برای مهار کنندگان کالمودولین، با اثر ضد التهابی مشاهده شده برای داروهای ضد افسردگی سه حلقه ای(۳۲،۳۷،۳۸) همانگی دارد.

در مقایسه ای که بین اثر ضد التهابی TFP و ایبوپروفن روی خیز سوختگی و خیز ناشی از کاراگینین انجام شد، آشکار گردید که اثر TFP بر روی محتوای رنگ یا نشت پروتئین در پوست سوخته قابل مقایسه با اثرا ایبوپروفن است، در حالی که اثر آن بر روی محتوای آب در پوست سوخته بیشتر از ایبوپروفن می باشد؛ همچنین مشابه با همین نتایج برای محتوای رنگ در پنجه ملتهب ناشی از کاراگینین بدست آمده است، اگرچه اثر ایبوپروفن در این نوع التهاب بر روی مهار افزایش حجم بیشتر از TFP است. گوناگونی اثر متفاوت دو داروی فوق بر روی نشت پروتئین و نشت آب نشانگر گوناگونی ساز و کارهای دخیل در پیدایش این دو پدیده است(۲۱). قابل مقایسه بودن اثر TFP با ایبوپروفن حاکی از این است که شاید یکی از مکانیسم های اصلی عمل ضد التهابی مهار کنندگان کالمودولین مهار مسیر تولید متابولیت های آسید آرشیدونیک باشد، همچنان که مهار این مسیر

مولکولی دقیق، اثرات مهاری TFP را بر روی خیز التهابی مشخص کنیم.

از آنجایی که داروهای فنتیازینی خصوصاً تریفلوئپرازین از طریق مهار گیرنده های D<sub>2</sub> پس سیناپسی در سطح هیپوفیز، موجب افزایش ترشح پرولاکتین می شوند(۳۲)، این احتمال نیز مطرح می شود، که شاید اثر ضد التهابی مشاهده شده برای تریفلوئپرازین مربوط به افزایش سطح پرولاکتین در خون باشد، اما به علت این که پرولاکتین باعث افزایش ترشح سیتوکین های التهاب زا(۳) از قبیل IL-1 و IL-6 می شود(۳۳) و همچنین از سوی دیگر گزارش شده است که در بیمارانی که آرتریت روماتوید دارند و پاسخ های التهابی آنها تشدید شده است، سطح پرولاکتین پلاسمای در آنها افزایش نشان می دهد(۳۴)، بنابراین پرولاکتین یک ماده التهاب زا محسوب می شود تا این که ضد التهابی باشد و بدین علت اثر ضد التهابی TFP نمی تواند با واسطه پرولاکتین اعمال شده باشد.

نتایج حاصل از سنجش اثر ضد التهابی TFP، CPT و TDPAC بر روی حجم مایع موضعی پنجه ملتهب شده از تزریق کاراگینین، نشانگر این است که تجویز ۳۲ mg/kg از TFP و TDPAC به ترتیب افزایش حجم پنجه را به میزان ۳/۸ درصد و ۳/۵ درصد مهار نموده است و همچنین TFP محتوای رنگ آبی ایوانز را در پنجه ملتهب ناشی از کاراگینین به میزان ۸/۴ درصد کاهش داده است. اثرات مهاری TFP و TDPAC روی خیز التهابی ناشی از کاراگینین معرف نقش داشتن کالمودولین در پیدایش این نوع التهاب نیز می باشد. دلیل احتمالی گوناگونی نتایج به دست آمده برای TFP در دو آزمایش خیز سوختگی و خیز التهابی ناشی از تزریق کاراگینین، این می باشد که مطالعات قبلی گزارش نموده اند که در پیدایش التهاب ناشی از کاراگینین، هم مسیر نوروزنیک نقش دارد و هم مسیر هورمونی(۱۳، ۳۵) و

استفاده از داروهای ضد التهابی غیر استروییدی یا استروییدی اثرات ناخواسته‌ای را ایجاد می‌کند، جایگزینی یا مصرف داروها فنوتیازینی خصوصاً TFP پیشنهاد می‌شود. اگر از نظر پاتوفیزیولوژی این اثرات در انسان تأیید شود، ممکن است این ترکیبات برای درمان بیماری‌های التهابی انسان نیز مفید باشند.

**سپاسگزاری**  
پژوهشگران بر خود لازم می‌دانند که از پژوهشکده مهندسی و علوم پزشکی جانبازان تهران و همچنین جناب آقای دکتر غلامعلی نادری به خاطر راهنمایی ارزشمندانش درجهت انجام این پژوهش قدردانی و تشکر به عمل آورند.

1. Warren JB. Vascular control of inflammatory oedema. *Clin. Sci. Colch.* 1993; 84(6): 581-4.
2. Demling RH. The effect of immediate and delayed cold immersion on burn oedema formation and resorption. *J. Trauma.* 1974; 19(1): 56-60.
3. Scott DT, Lam FY. Acute joint inflammation-mechanisms and mediators. *Gen. Pharmacol.* 1994; 25(7): 1285-96.
4. De Vries GW, McLaughlin A. The antiinflammatory activity of topically applied novel calcium channel antagonists. *Inflammation.* 1995; 19(2): 261-75.
5. Southan GJ, Szabo C. Selection pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Biochem. Pharmacol.* 1995; 51(4): 383-94.

توسط ایبوپروفن رخ می‌دهد. علاوه بر این، مطالعه حاضر ممکن است این احتمال را افزایش دهد که عمل مهارکنندگی ایبوپروفن و سایر داروهای ضدالتهاب غیر استروییدی فعالیت کالمودولین را در *in vitro* مهار می‌کنند.<sup>(۴۰، ۳۹)</sup>

در مجموع پژوهش حاضر نشان داد که مصرف مهارکننده کالمودولین (TFP) خیز التهابی حاد بعد از سوختگی و خیز التهابی حاد ناشی از تزریق کاراگیتین را مهار می‌نماید. علاوه بر این، پژوهش حاضر تأییدی برای گزارش‌های دیگران راجع به اثرات غیر مغزی داروهای فنوتیازینی است و این که داروهای فوق که امروزه در کلینیک برای درمان استفاده می‌شوند، احتمالاً در درمان خیز التهابی نیز مؤثر می‌باشند. بنابراین در شرایطی که

## فهرست منابع

6. Fujishima Y, Hara H. The effects of a novel  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker, KB-2760, on 5-HT-induced responses. *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 1994; 104(1): 19-29.
7. Kakiuchi S, Yamazaki R. Calcium dependent phosphodiesterase activity and its activating factor (PAF) from brain. *Biochem-Biophys. Res. Commun.* 1970; 41: 1104-10.
8. Norman JA, et al. CGS 9343B, a novel, potent, and selective inhibitor of calmodulin activity. *Mol. Pharmacol.* 1987; 31: 538-40.
9. Prozialeck WC, Weiss B. Inhibition calmodulin by phenothiazines and related drugs: structure-activity relationships. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1982; 22(3): 504-16.
10. Walenga RW, Opas EE. Differential effects of calmodulin antagonists on

- phospholipases A and C in thrombin-stimulated platelets. *J. Biol. Chem.* 1981; 265(23): 12523-8.
11. Craven PA, DeRubertis FR.  $\text{Ca}^{2+}$  calmodulin-dependent release of arachidonic acid from renal medullary prostaglandin synthesis. *J. Biol. Chem.* 1983; 258(8): 4814-23.
  12. Guarner V, Hernandez EH, Huerto R, Gorostiza P, Valenzuela F. Trifluoperazine inhibition of insulin-induced increase in skeletal muscle glucose uptake. *Eur. J. Pharmacol.* 1993; 237: 139-41.
  13. Bianchi M, Rossoni G, Sacerdote P, Panerai AE, Berti F. Effects of chlomipramine and fluoxetine on subcutaneous carrageenin-induced inflammation in the rat. *Inflamm. Res.* 1995; 44: 466-9.
  14. Farzami B, Moosavi Movahedi AA, Naderi GA. Elucidation of  $\text{Pka}$  values for  $\text{Ca}^{2+}$  binding sites in calmodulin by spectrofluorometry. *Int. J. Biol. Macromol.* 1994; 16(4): 181-6.
  15. Naderi GA, Farzami B, Moosavi Movahedi AA. Spectroscopic studies of inhibition of calmodulin activity by some drugs. *Acta Medica Iranica.* 1996; 34(182): 20-5.
  16. Beitner R, et al. Therapeutic and prophylactic treatment of skin burns with several calmodulin antagonists. *Gen. Pharmacol.* 1989; 20(2): 165-73.
  17. Beitner R, Chen Zion M, Sofer Bassukowitz. Treatment of frostbite with the calmodulin antagonists thioridazine and trifluoprazine. *Gen. Pharmacol.* 1989; 20(5): 651-6.
  18. Levin RM, Weiss B. Mechanism by which psychotropic drugs inhibit adenosine cyclic 3', 5' monophosphate phosphodiesterase of brain. *Mol. Pharmacol.* 1976; 12: 581-9.
  19. Beitner R, Chen-zion M, Bassukowitz Y. Effect of the calmodulin antagonist CGS 9343B on skin burns. *Gen. Pharmacol.* 1991; 22(1): 67-72.
  ٢٠. خاکساری، محمد. اثر آیوپروفن و متی مازول بر خیز ناشی از سوختگی. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ۱۳۷۴، دوره دوم، شماره ۳، ۱۲۰-۷: ۱۳۷۴
  21. Alexander F, Mathieson M, Teoh KH. Arachidonic acid metabolites mediate early burn edema. *J. Trauma.* 1984; 24(8): 706-12.
  22. Sitting K, Deitch EA. Effect of bactriema on mortality after thermal injury. *Arch. Surg.* 1998; 123: 1367-70.
  23. Wirth KJ, Alpermann HG. The bradykinin antagonist Hoe 140 inhibits carrageenan and thermically induced paw edema in rats. *Recent Progress on Kinins.* 1992; 428-31.
  24. Gilligan JP, Lovato SJ. Modulation of carrageenan-induced hind paw edema by substance P. *Inflammation* 1994; 18(3): 285-92.
  25. Waymack JP, Yurt RW. Effect of prostaglandin E on immune function in

- multiple animal models. *Arch Surg.* 1988; 123(11): 1429-39.
26. Hanaha S, Sertie JA. Miconazole as inflammatory agent-I cellular and pathophysiological effects. *Gen.Pharmacol.* 1994; 25(4): 713-7.
27. Amorim CZ, Sergio R. Interference of PCA 4248, a novel PAF receptor antagonist, with antigen-induced paw edema in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 1993; 236: 301-4.
28. Frucht H, Kaplansky M, Beitner R. Increase in glucose 1.6 biphosphate levels, activeation of phosphofructokinase and phosphoglucomutase and inhibition of glucose 1.6 Biphosphatase in muscle induced by trifluoperazine. *Bio. Med.* 1984; 31: 122-9.
29. Bruna RD, Pinet F, Corvol P, Kurtz A. Calmodulin antagonists stimulate renin secretion and inhibit renin synthesis in vitro. *Am. J. Physiol.* 1992; 262(31): 397-402.
30. Menendez HL, Perez Vallina JR, Cantabrana B, Hidalgo A, Badmonde A. Calmodulin inhibitors induce spinal analgesia in rats. *Brain Res.* 1996; 731: 114-21.
31. Bianchi M, Sacerdote P, Panerai AE. Fluoxetine reduces inflammatory edema in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 1994; 263(1-2): 81-4.
32. Katzung BG. Basic and clinical pharmacology. 6<sup>th</sup>.ed.*Lange medical book.* 1995: 432-47.
33. Zhu XH, Zellweger R, Wichmann MW. Effect of prolactin and expression in late sepsis. *Cytokines.* 1997; 9(6): 437-46.
34. Chikanza IC, Grossman As. Hypothalamic-pituitary-mediated immunomodulation: arginine vasopressin is a neuroendocrine immune mediatoe. *Br. J. Rheumatol.* 1998; 37(2): 131-6.
35. Scott DT, Lam FY. Acute inflammation enhances substance p and plasma protein extravasation in the rat knee joint. *Regulatory Peptides.* 1992; 39: 227-35.
36. Moskowitz N, Shapiro L, Schook W, Puszin S. Phospholipase A<sub>2</sub> modulation by calmodulin, prostaglandins and cyclic nucleotides. *Biochem.Biohy.Res.Commu.* 1983; 115(1): 94-9.
37. Bianchi M, Sacerdote P, Panerai AE. Chlomipramine differently affects inflammatory edema and pain in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behar.* 1994; 48(4): 1037-40.
38. Michelson D, Misiewicz Poltorak B, Raybourne RB, Gold PW. Imipramine reduces the local inflammatory responses to carrageenin. *Agents Actions.* 1994; 42(1-2): 25-8.
39. Cantabrana B, Perez Vallina JR, Menendez L, Hidalgo A. Spasmolytic and calmodulin inhibitory effect on

- non-steroidal anti-inflammatory drugs  
in vitro. *Life Sci.* 1995; 57(14): 1333-41.
40. McCormack K. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and spinal nociceptive processing. *Pain*. 1994; 59(1): 9-43.