

Role of serum interleukin-6 level on hyperalgesia and spinal mu-opioid receptor expression during the complete Freund's adjuvant-induced chronic inflammation

Tekieh E¹, Zaringhalam J^{1*}, Manaheji H¹, Zeinalzadeh E²

1- Department of Physiology, Neuroscience Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran.

2- Department of Pharmacology, International Branch, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran.

Received September 18, 2011; Accepted February 23, 2012

Abstract:

Background: Interleukin (IL-6) is known to cause pro- and anti-inflammatory effects during different stages of inflammation. The purpose of this study was to elucidate the effects of IL-6 on hyperalgesia, edema and the changes in the spinal mu opioid receptor expression during different stages of complete Freund's adjuvant (CFA)-induced arthritis (AA) in rats.

Materials and Methods: In this study, AA was induced by a single subcutaneous injection of CFA into rats' hindpaw. The rats with arthritis were divided into four groups, each consisted of three subgroups ($n=6$). Anti-IL-6 was administered either daily or weekly during the 21-day study period. Spinal mu-opioid receptor (mOR) expression was detected by Western blotting.

Results: Daily treatment with an anti-IL-6 antibody significantly decreased the paw edema in the AA group compared to the control one ($P=0.001$), but daily and weekly anti-IL-6 administrations significantly increased the hyperalgesia in the antibody-treated group on the 14th and 21st days post-treatment ($P=0.001$, $P=0.01$, respectively). The administration of IL-6 antibody not only increased hyperalgesia in a time-dependent manner, but also caused a significant reduction in the spinal mOR expression on the 14th and 21st days post-CFA injection ($P=0.01$, $P=0.001$, respectively).

Conclusion: Results can indicate the importance of a time-dependent relationship between the serum IL-6 level and hyperalgesia during the AA. Moreover, the results suggest that the stages of inflammation in AA must be considered for anti-hyperalgesic and anti-inflammatory interventions via anti-IL-6 antibody treatment.

Keywords: Interleukin-6, Hyperalgesia, Inflammation, Complete Freund's adjuvant

*** Corresponding Author.**

Email: jzaringhalam@yahoo.com

Tel: 0098 21 224 39971

Fax: 0098 21 224 39971

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences July, 2012; Vol. 16, No 3, Pages 196-204

Please cite this article as: Elaheh Tekieh, Jalal Zaringhalam, Homa manaheji, Elnaz Zeinalzadeh. Role of serum interleukin-6 level on hyperalgesia and spinal mu-opioid receptor expression during the complete Freund's adjuvant-induced chronic inflammation. *Feyz* 2012;

16(3): 196-204.

تأثیر سطوح سرمی ایترلوکین-۶ بر روی هایپرآلرژی و بیان گیرنده‌های اوپیوئیدی مخاطی در طی التهاب مزمن ایجاد شده به وسیله‌ی ادجوانات کامل فروند

الهه تکیه^۱، جلال زرین قلم^۲، هما مناهجی^۱، الناز زینال زاده^۱

خلاصه:

سابقه و هدف: IL-6 سایتوکاینی دارای خصوصیات دوگانه القاء‌کننده و ضد التهاب است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات IL-6 بر روند هایپرآلرژی، ادم و تغییرات بیان گیرنده‌های اوپیوئیدی مو نخاعی در طی مراحل مختلف آرتیت مزمن (AA) ناشی از تزریق CFA است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه کاربردی- بنیادی، آرتیت به وسیله‌ی یکبار تزریق کفت پایی CFA در موش‌های صحرایی ایجاد شده و به ۴ گروه، و هر گروه به سه زیرگروه ۶ تائی، تقسیم شدند. آنتی-IL-6 بهدو صورت روزانه و هفتگی در طی ۲۱ روز مطالعه تزریق شد. میزان بیان گیرنده‌های اوپیوئیدی مو (mOR) نخاعی به وسیله‌ی تکیک و سترن بلاتینگ تعیین شد.

نتایج: تیمار روزانه با آنتی‌بادی anti-IL-6 به طور مشخصی باعث کاهش ادم پا در گروه AA در مقایسه با گروه کنترل AA شد ($P=0.001$)، در حالی که تزریق روزانه و هفتگی anti-IL-6 هایپرآلرژی را در گروهایی که با آنتی‌بادی تیمار شده بودند، در روزهای ۱۴ و ۲۱ به طور مشخصی افزایش داد (بهترتب، $P=0.01$). آنتی‌بادی anti-IL-6 به صورت واپسی به زمان باعث افزایش هایپرآلرژی و کاهش مشخص بیان mOR (بهترتب، $P=0.01$) در روزهای ۱۴ و ۲۱ بعد از تزریق CFA شد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه اهمیت ارتباط واپسی به زمان بین سطوح سرمی IL-6 و هایپرآلرژی طی آرتیت مزمن را نشان داده و نتایج آن پیشنهاد می‌کنند که طی درمان‌های ضد التهابی با داروهای ضد سایتوکاینی مانند anti-IL-6 توجه به مرحله بیماری التهابی آرتیت روماتوید بسیار مهم است.

واژگان کلیدی: ایترلوکین-۶، هایپرآلرژی، التهاب، ادجوانات کامل فروند

دو ماهنامه علمی-پژوهشی فیض، دوره شانزدهم، شماره ۳، مرداد و شهریور ۱۳۹۱، صفحات ۲۰۴-۱۹۶

مطالعات بسیاری اهمیت سایتوکاین‌ها را در دردهای مزمن نشان داده‌اند [۴، ۵]. در مطالعات قبلی نشان داده شده است که تزریق موضعی CFA در موش‌های صحرایی باعث افزایش ترشح سیستمیک و موضعی سایتوکاین‌هایی مثل IL-6، IL-1، TNFα و TNFβ می‌شود [۳]. سایتوکاینی با توانایی‌های مختلف است که در ابتدا به عنوان یک فاکتور تمایز یافته از T-cell و B-cell شناخته شده است و فعالیت‌های مختلفی را در سیستم‌های بیولوژیکی ایفا می‌کند. عدم تنظیم بیان IL-6 منجر سنتز و ترشح تعدادی از میانچی‌های التهاب می‌شود که در نهایت منجر به درد می‌شوند [۶]. با توجه به اثرات تحریکی متعدد IL-6 بر روی سلول‌های سیستم ایمنی و سلول‌های اندوتیلیال رگی این اعتقاد وجود دارد که IL-6 نقش پاتولوژیک مهمی را در پیشرفت التهاب که منجر به هایپرآلرژی و ادم می‌شود، ایفا می‌کند [۷]. مطالعه قبلی ما نیز نشان داد که هایپرآلرژی ایجاد شده به وسیله‌ی CFA تا روز ۷ بعد از تزریق ادامه پیدا می‌کند که با افزایش مدیاتورهای التهابی بهویژه IL-6 مرتبط است [۸]. میانچی‌گری پاسخ‌های ایمنی در القاء درد و التهاب یکی از موضوعات مورد علاقه محققین در سال‌های اخیر بوده است. مطالعات گذشته نشان داده‌اند که در بروز بسیاری از علایم التهابی IL-6 یک نقش مرکزی را ایفا می-

مقدمه

تزریق کفت پایی Complete Freund's Adjuvant (CFA) باعث ایجاد آرتیت (AA) در موش‌های صحرایی می‌شود که شباهت بسیاری به آرتیت روماتوئید (AA) در انسان دارد [۱]. این مدل به عنوان یک مدل مونوآرتیتی به طور گسترده‌ای در تحقیقات دارویی و مولکولی استفاده می‌گردد. التهاب و علائم آن نتیجه‌ی افزایش سریع ترشح میانچی‌های التهابی شامل کمو-کاین‌ها و سایتوکاین‌هایی مانند ایترلوکین‌های ۱ و ۶ (IL-1 & IL-6) و فاکتور نکروز دهنده تومور α (TNFα) است [۳، ۲]. میانچی‌های التهابی با مداخله در رونویسی ژن، سنتز پروتئین‌ها و گیرنده‌های درد، ازدیاد حساسیت گیرنده‌ها و تغییر سرعت هدایت فیبرهای عصبی مربوطه، در ایجاد درد مداخله می‌کنند.

^۱ استادیار، گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

^۲ دانشجو، گروه داروسازی، شعبه بین الملل دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

* **نشانی نویسنده مسئول:** تهران، گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

تلفن: ۰۲۱ ۲۲۴۳۹۹۷۱؛ دوچرخه‌سواری: ۰۲۱ ۲۲۴۳۹۹۷۱

پست الکترونیک: jzaringhalam@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۰/۶/۲۷؛ تاریخ انتشار: ۹۰/۱۲/۴

استاندارد (22 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۷۰-۶۰ درصد و سیکل زمانی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) نگهداری شدند. غذا و آب کافی هم در اختیار همه حیوانات قرار گرفت. روش استفاده از حیوانات آزمایشگاهی براساس قوانین کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی بوده و ایجاد درد در حیوانات آزمایشگاهی نیز طبق استانداردهای Zimmerman صورت گرفت [۱۳].

ایجاد التهاب ناشی از CFA:

CFA التهاب بهوسیلهٔ تزریق زیر جلدی (1ml ۱۰۰ μl مایکوپاکتیریم توبرکلوزیس تضعیف شده) حل شده در روغن معدنی استریل (Sigma, St Louis, MO, USA) با دوز ۱۰ mg/ml به کف پای راست حیوانات در روز صفر ایجاد شد. موش‌های کنترل فقط روغن معدنی استریل (1ml ۱۰۰ μl) دریافت کردند. روز اول بعد از تزریق CFA به کف پا، ادم یکطرفه در همان پا ایجاد می‌گردد و این شرایط طی ۲۱ روز بعد از تزریق نیز ادامه پیدا می‌کند. لازم بهذکر است که طبق مطالعات قبلی انجام شده در این آزمایشگاه و دیگران هفته اول بیماری را فاز التهابی (آرتربیتی حاد) و هفته دوم و سوم را تحت عنوان فاز مزمن آرتربیتی در نظر می‌گیرند [۱-۳].

سنجهش ادم پا:

برای تایید سنجهش تزریق صحیح CFA، حجم هر پا قبل و بعد از تزریق در طی زمان‌های متفاوت مورد سنجهش قرار گرفت. سنجهش حجم پا بهوسیلهٔ جابه‌جایی یک محلول الکترولیتی در پلتیسمومتر (Italy) انجام شد. به‌طور خلاصه، پای موش‌های صحرائی درون یک محفظهٔ شفاف حاوی محلول الکترولیتی شفاف فرو برده شده و حجم مایع جابه‌جا شده که با حجم پا برابر است بهوسیلهٔ یک نشان‌گر دیجیتال نمایش داده شد. اندازه‌گیری حجم برای هر پا دوبار انجام شده و میانگین آنها محاسبه شد. مقدار ادم بهوسیله سنجهش تفاوت حجم پا بین روز صفر و زمان‌های مختلف محاسبه شد و حجم اندازه‌گیری شده بهوسیلهٔ درصد حجم نسبت به روز صفر گزارش گردید.

سنجهش هایپرآلرژی حرارتی:

(PWL: paw withdrawal latency) پس کشیدن پا در اثر حرارت بهوسیلهٔ تست‌های کف‌پایی (Ugo Basile, Italy) در گروه‌های کنترل و آزمایش انجام شد. حیوانات

کند؛ به‌طوری‌که مهار آن روشی جدید برای درمان التهاب‌های مزمن بهشمار می‌رود [۹]. همچنین مطالعات ثابت کرده‌اند بعضی از عالیم التهابی آرتربیت روماتوئید با این سایتوکاین (IL-6) در ارتباط بوده و می‌توان آرتربیت روماتوئید را بهوسیلهٔ مهار آن درمان کرد [۹]. از سوی دیگر برخی مطالعات اثرات تقویت کننده التهاب و ضد التهابی IL-6 را نشان داده است که اهمیت ویژه‌ای در درمان بیماری‌های التهابی با این سایتوکاین دارد. برخی مطالعات حاکی از این هست که IL-6 همچنین از طریق فعال کردن سیستم اپیبوئیدی درونی باعث ایجاد بی‌دردی در مدل‌های حیوانی التهاب می‌شود، که البته این حالت نیز به‌عنوان یک پاسخ تعدیلی اندوژن در روند التهاب محيطی محسوب می‌شود [۱۰]. مطالعات قبلی ما حاکی از تداوم ۲۱ روزه هایپرآلرژی در سه هفته بعد از تزریق CFA می‌باشد. در آن مطالعه نشان داده شد که هایپرآلرژی پای درگیر از هفته دوم به بعد کاهش نشان می‌دهد [۱۱]. در ادامه با توجه به نقش مهم اپیبوئیدها در کاهش درد طی التهاب در شرایط مختلف بالینی و آزمایشگاهی، بررسی‌های بیشتر حاکی از افزایش بیان گیرنده‌های اپیبوئیدی موخاخ طی التهاب بود که می‌توانست توجیه مناسبی بر اثرات ضد دردی اپیبوئیدهای درون‌ریز طی التهاب باشد [۸]. بیان شده است موش‌هایی که دارای اختلال در بیان سایتوکاین IL-6 هستند، دچار کاهش پاسخ‌های بی‌دردی به مورفین (آگونیست mOR) و کاهش تراکم گیرنده‌های Mu در ماده خاکستری midbrain می‌شوند [۱۲]. بنابراین با توجه به نقش دوگانه و عمدۀ IL-6 در طی التهاب و تاثیر آن بر روی بیان گیرنده‌های مرتبط با درد، بهویژه گیرنده‌های اپیبوئیدی mu و استفاده از آنتی‌سایتوکاین‌ها برای درمان بیماری‌های التهابی در تحقیقات اخیر، این مطالعه بهمنظور روش‌ن شدن بیشتر اثرات IL-6 در هایپرآلرژی و ادم در طی مراحل مختلف آرتربیت مزمن ایجاد شده بهوسیله CFA و بررسی اثرات درمان با آنتی IL-6 بروی بیان mOR نخاعی طراحی گردید.

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی:

در این آزمایش از ۷۲ سر موش صحرائی نر نژاد ویستار با میانگین وزنی ۱۸۰-۲۰۰ گرم استفاده شد که به ۴ گروه اصلی ۱: گروه CFA، ۲: گروه CFA+PBS، ۳: گروه IL-6+CFA (تزریق روزانه)، ۴: گروه IL-6+Anti CFA (تزریق روزانه)، هر گروه بهنوبه خود به ۳ زیر گروه (شامل روزهای ۲۱، ۱۴ و ۰) تقسیم شدند. هر گروه بهنوبه خود به ۶ سر موش در نظر گرفته شد. حیوانات در قفس‌های پلی‌پروپیلن در شرایط

سنجهش بیان mOR نخاعی با تکنیک Western blotting بعد از تست های رفتاری، برای سنجش میزان بیان mOR در نخاع از روش وسترن بلاط استفاده شد [۱۵]. موش های صحرائی با استفاده از ایزو فلوران بیهوده شده و نخاع آنها به سرعت خارج شده و در پیخ گذاشته قرار گرفت، سپس در بافر استخراج محتوی مخلوط مهار کننده پروتئیناز (۵۰ mM Tris-HCl, PH7.5, ۱۵۰ mM NaCl, ۱ mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), ۱% NP40, ۰.۵ % sodium dodecyl sulfate (SDS), ۱ mM sodium orthovanadate, ۲.۵ µg/ml aprotinin, ۲ µg/ml leupetin, ۲ µg/ml pepstatin A (با دور ۲۰۰۰۰ ثانیه هموژنیزه شدن) (Brinkman Polytron Homogenizer) یفیوژ با دور ۱۰۰۰۰ در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. محلول رویی برای سنجش غلظت پروتئین جدا شد [۱۶]. مقدار مساوی از پروتئین ها (۶۰ µg) برای ترکیب شدن با ۴ % SDS, ۲۵ mM Tris-HCl (loading buffer) pH 6.8, ۵ % glycerol, ۰.۵ % 2-mercaptoethanol, ۰.۰۰۵ % bromophenolblue ۱۰ دقیقه جوشانده شده و به مقدار مساوی (۱۲ µl) در ژل پلی-اکریل آمید (Pager Gels) ۱۰ % Tris-Glycine, Bio-Rad (Bio-Rad II) بهروش الکتروفورز برای ۶۰ دقیقه با ولتاژ ۱۲۰ V از هم جدا شدند. پروتئین ها با استفاده از (miniprotean II) (Bio-Rad) PVDF ولتاژ ۱۰۰ V به مدت ۸۵ دقیقه از روی ژل بر روی کاغذ (Millipore, Bedford, MA) منتقل شدند. سایت های غیر اختصاصی موجود بر کاغذ به وسیله ای انکوباسیون با بافر بلاکینگ (0.2% Aurora Blocking Reagent; 1X Phosphate Buffered Saline: 0.058 M Na2HPO4, 0.017 M NaH2PO4, 0.068 M NaCl; ۰.۰۵ % Tween-20 from ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA در دمای ۲۴ درجه پوشانده شده و سپس به مدت یک ساعت در دمای ۲۴ درجه با آنتی بادی اولیه محلول در بافر بلاکینگ (polyclonal IgG for mOR (1:1000); Abcam/CA کاغذها دوباره با بافر بلاکینگ شستشو داده شده و سپس با آنتی بادی ثانویه (Anti-rabbit IgG (1:10000), abcam/CA) محلول در بافر بلاکینگ به مدت یک ساعت در دمای ۲۴ درجه انکوبه شدند. کاغذها ۳ بار با بافر بلاکینگ شسته شدند. فعالیت پروتئین ها با استفاده از سیستم ظهورگر کمی لومینسانس (ECL, Amersham) تشخیص داده شد. کاغذها با محلول (mercaptoethanol, ۲ % SDS, ۶۲.۵ mM Tris [pH 6.7]) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه و با آنتی بادی اولیه beta-actin (1:5000; Cell Signaling) انکوبه شدند. تراکم باندها به وسیله ای نرم افزار سنجش تراکم NIH

در اتفاق کهای پلکسی گلاس به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه قبل از آزمایش قرار داده شدند تا به محیط آزمایش عادت کنند. عقب کشیدن پا به طور اتوماتیک به وسیله ای تایمر دیجیتال که به یک منبع حراموش صحرائی متصل است، ثبت شد. در این روش بخش میانی کف پای حیوان در معرض اشعه مادون قرمز نقطه ای قرار گرفته و زمان تاخیر در پس کشیدن پا ثبت می گردد. ۳ PWL بار برای هر پا در یک فاصله زمانی ۵-۱۰ دقیقه سنجیده شده و مقدار میانگین محاسبه شد. Cut off در نظر گرفته شده در این آزمایش ۲۰ ثانیه بود. مقدار میانگین محاسبه شده پای تزریق شده، از مقدار میانگین محاسبه شده مربوط به پای دیگر کم گردید و مقدار به دست آمده در صوموش صحرائی منفی بودن نشان دهنده هایپرآلزی در پای مورد نظر بود [۳].

سنجهش سطوح IL-6 سرمی در نمونه های خونی:
نمونه خونی از عروق موش صحرائی و اوربیتال گوشه چشم حیوانات بیهوده شده با ایزو فلوران و به وسیله ای لوله مویین هپارینه تهیه شد. نمونه های اخذ شده، سانتریفیوژ گردیده و سرم حاصل در دمای ۷-۷۰ درجه سانتی گراد ذخیره شد (در نمونه گیری از تمامی گروه ها سعی بر آن بود که نمونه گیری در حدود ۸ تا ۱۵ دقیقه صحیح انجام شود). سطوح سرمی IL-6 به وسیله ای Bender Med System, ELISA استاندارد موش صحرائی (UK) و براساس دستورالعمل کیت سنجیده شد. محدوده سنجش حدود ۱۳/۲ pg/ml بود.

تجویز آنتی بادی Anti IL-6:
برای سنجش نقش IL-6 در ایجاد علائم AA، به منظور کاهش سطوح سرمی IL-6، حیوانات با آنتی بادی anti-IL-6 IL-6 تیمار شدند. آنتی بادی IL-6 R&D توسط سیستم های (Abcam/Uk) تهیه شد. این آنتی بادی با تزریق E-coli حاوی Abcam ژن IL-6 موش صحرائی به بز از مسیر نوترکیبی توسط تهیه گردیده بود. بعضی مطالعات، فعالیت موثر این آنتی بادی نوترکیب را در موش صحرائی نشان داده اند [۱۴]. نظر به این مطالعات و طبق دستورالعمل کارخانه تولید کننده (catalogue number ab9770) دوز خشتنی کننده (ND₅₀) برای آنتی بادی 0.003-0.1 ng/ml rat IL-6 anti-rat IL-6 ۰.۰۰۵ µg/ml در این مطالعه، در نظر گرفته شد. آنتی بادی تخلیص شده IL-6 در محلول PBS برای تزریق داخل صفاقی رقیق شده و گروه کنترل فقط PBS دریافت کردند. این محلول به صورت تازه و ۳۰ دقیقه قبل از تزریق تهیه گردید.

شد که تا روز ۲۱ مطالعه ادامه پیدا کرد. حجم پا در روز ۲۱ در مقایسه با روز صفر بیشتر بود ($P=0.001$). تزریق روزانه و هفتگی آنتی بادی ۶ IL-6 در گروه AA باعث کاهش حجم پا در مقایسه با گروه کنترل AA شد ($P=0.001$). همچنین، لازم به ذکر است که علی‌رغم کاهش ادم پا در روزهای ۱۴ و ۲۱ بدنبال تجویز آنتی-بادی ۶ IL-6 حجم کماکان از روز صفر بیشتر بود و تفاوت مشخصی در کاهش حجم پا بین تزریق روزانه و هفتگی anti-IL-6 و نیز بین حجم پا در گروه CFA و گروه vehicle +CFA وجود نداشت (جدول شماره ۱). (PBS)

جدول شماره ۱- درصد تغییرات حجم پا در طی مراحل مختلف AA در گروههای مورد مطالعه

روزهای مطالعه				
۲۱	۱۴	۰		
۸۷±۱/۱ ***	۷۶±۱/۴ ***	۰±۱/۲	CFA	- گروه
۸۹±۱ ***	۷۵±۱/۵ ***	۰±۱/۱	CFA+PBS	های
۳۷±۵±۲/۱ ***	۳۷±۲/۶ ***	۰±۲	CFA+anti-IL-6(W):	مطالعه
۳۴/۱±۲/۳ ***	۳۵±۲/۵ ***	۰±۲/۱	anti-IL-6(D):	

تزریق CFA موجب ایجاد ادم در پای تزریق شده گردید که تا روز ۲۱ بعد از تزریق ادامه داشت و درمان با آنتی بادی ۶ Anti-IL-6 باعث کاهش حجم پا شد. داده‌ها به صورت میانگین \pm SEM نشان داده شده‌اند. $*P=0.001$: افزایش معنی‌دار حجم پا تزریق شده را در طی روزهای مختلف مطالعه در مقایسه با روز صفر. $***P=0.001$: مقایسه تفاوت حجم پا بین موش سحرانی‌های تیمار شده با CFA و گروه تیمار شده با anti-IL-6.

تغییرات هایپرآلرژی حرارتی در طی مراحل مختلف AA:

هایپرآلرژی حرارتی ایجاد شده در پای چپ در طی مراحل مختلف AA متفاوت بود. سنجش PWL در گروه AA نشان داد که هایپرآلرژی، بعد از تزریق CFA به طور معنی‌داری در روز ۱۴ و ۲۱ در مقایسه با روز صفر ($P=0.01$, $P=0.05$) و در روز ۲۱ نیز در مقایسه با روز ۱۴ کاهش داشته است ($P=0.001$). گروههای آزمایشی تیمار شده با آنتی بادی افزایش معنی‌داری را در هایپرآلرژی در روزهای ۱۴ و ۲۱ در مقایسه با گروه کنترل AA نشان دادند ($P=0.001$, $P=0.01$). تفاوت معنی‌داری در هایپرآلرژی گروههای مورد مطالعه طی تیمار روزانه و هفتگی آنتی بادی ۶ anti-IL-6 وجود نداشت. همچنین تفاوت مشخصی در هایپرآلرژی در طی فازهای مختلف AA بین گروه CFA و گروه vehicle+CFA وجود نداشت (جدول شماره ۲).

نتایج(1.60)، سنجیده شد و به صورت نسبت تراکم به mOR تراکم β-actin بیان شد.

طراحی مطالعه:

به وسیله‌ی تزریق زیر پوستی CFA در پای چپ حیوانات در روز صفر (تحت بیهوشی سطحی) در گروههای آزمایش ایجاد شد. برای تعیین میزان تاثیرگذاری سطوح IL-6 بر درد، ادم و تعیین چگونگی اثرات وابسته به زمان آنها، آزمایش‌های مختلفی انجام شد. یک دوز خشی anti-IL-6 محلول در PBS (0.1 µg/ml) (تھیه شده و از روز اول بعد از تزریق CFA به مدت ۲۱ روز به صورت داخل صفاقی به دو ترتیب روزانه و یا هفتگی تزریق شد [۱۷, ۱۶]. بررسی‌های مولکولی، رفتاری، سنجش حجم پا و سطح سرمی IL-6 در روز صفر (قبل از تزریق CFA) و ۱۴ و ۲۱ (فاز آرتیتی)، ۳۰ دقیقه قبل از تزریق آنتی بادی انجام شد. میزان بیان گیرنده‌های مو نخاعی به وسیله‌ی وسترن بلاستینگ در روزهای ۰، ۱۴ و ۲۱ در گروههای AA، AA همراه با anti-IL-6 (تزریق روزانه و یا هفتگی) و AA همراه با PBS (گروه شاهد) مورد سنجش قرار گرفت. این بررسی‌ها در گروه کنترل هم انجام گرفت. در روزهای تعیین شده در هر گروه، حیوانات با متوكسی فلوران بیهوش شده و با استفاده از گردن زدن کشته شده، نخاع آنها به طور کامل خارج گردید و ابتدا در نیتروژن مایع سپس در دمای -۸۰- فریز شدند تا میزان بیان گیرنده‌های mu نخاعی به روشن وسترن بلاست مورد سنجش قرار گیرد.

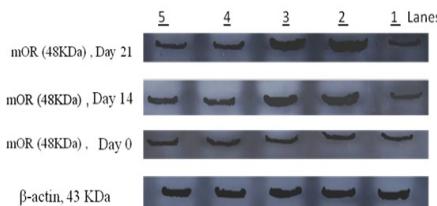
آنالیزهای آماری:

نتایج به صورت میانگین \pm انحراف از معیار استاندارد (SEM) گزارش شدند. آزمایشات وسترن بلاست در دو یا سه زمان unpaired t-test آنالیز شد. بررسی‌های درون گروهی هایپرآلرژی حرارتی، ادم و سطح سرمی IL-6 با استفاده از ANOVA یک طرفه و برای نیل به نتایج دقیق‌تر از post hoc Tukey's Unpaired t-test استفاده شد. بررسی‌های بین گروهی نیز برای دقت بیشتر از Unpaired t-test شد. $P<0.05$ به معنی وجود اختلاف معنی‌دار در مطالعه در نظر گرفته شد.

نتایج

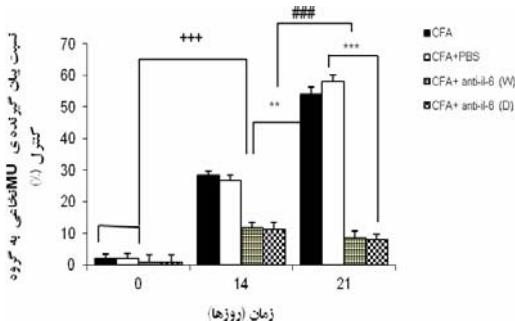
تغییرات حجم پا در طی مراحل مختلف AA: تزریق CFA باعث افزایش یک‌طرفه حجم پا (پای چپ)

ها را نشان داد، که با گزارشات اولیه تطبیق داشت. بعد از مشاهده‌ی باندهای mOR شده و دوباره با آنتی‌بادی β -actin به عنوان نمونه کنترل پوشانده شدند (43 kDa) (شکل شماره ۱). همه داده‌ها به صورت نسبت mOR/β -actin بیان شدند.



شکل شماره ۱- بیان پروتئین گیرنده mOR استخراج شده از نخاع در طی مراحل مختلف فاز مزمز AA (روزهای صفر، ۱۴ و ۲۱). گروهها عبارتند از: ۱- گروه کنترل، ۲- گروه AA، ۳- گروه AA+PBS و ۴- گروهی که به صورت روزانه با آنتی بادی anti-IL-6 درمان شده اند و ۵- گروهی که به صورت هفتگی با آنتی بادی anti-IL-6 درمان شده اند. -
β actin به عنوان کنترل استفاده شده است.

آنالیزهای دانسته‌نمتری ثابت کرد که AA به صورت وابسته به زمان منجر به افزایش معنی‌دار بیان پروتئین mOR در روزهای ۱۴ و ۲۱ در مقایسه با گروه کنترل و روز صفر همان گروه گردیده است ($P=0.001$). بیان پروتئین mOR نخاعی در گروه AA در روز ۲۱ در مقایسه با روز ۱۴ بعد از تزریق CFA به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P=0.001$) (شکل شماره ۲).



شکل شماره ۲- تحریق CFA باعث افزایش معنی دار بیان mOR نخاعی به صورت anti-IL-6 باعث وابسته به زمان شد. مصرف آنتی بادی anti-IL-6 به صورت روزانه و هفتگی باعث کاهش بیان mOR در طی مراحل مختلف فاز مزمن گردید. همچنین، نسبت تراکم باندهای پروتئینی mOR نخاعی در گروه AA+anti-IL-6 در روزهای ۱۴ و ۲۱ در مقایسه با گروه کنترل AA SEM \pm بیان شده اند.^{0.001} کاهش یافت. داده ها به صورت میانگین \pm SEM \pm بیان شده اند.^{0.001} + + + مقایسه تراکم باندهای پروتئینی mOR نخاعی بین روزهای مختلف فاز مزمن AA مقایسه تراکم باندهای AA+anti-IL-6 در روزهای ۱۴ و ۲۱^{**P=0.001}. مقایسه تراکم باندهای پروتئینی mOR بین گروه های AA و AA+anti-IL-6 در روزهای متناسب. ^{###P=0.001} مقایسه تفاوت تراکم باند پروتئینی mOR در گروه AA و گروه تمیل شده با anti-IL-6 در روزهای ۱۴ و ۲۱^{**P<0.001}.

جدول شماره ۲- تغییرات هایپرآرژی حرارتی در طی مراحل مختلف AA در گروههای مورد مطالعه

روزهای مطالعه			
۲۱	۱۴	.	
-۰/۸±۰/۴ *	-۲/۶±۰/۳ **	۰/۷±۰/۱	CFA
-۰/۹±۰/۳ *	-۲/۶±۰/۲ **	۰/۲±۰/۱	CFA+PBS
+++ ####	++ ####	۱/۱±۰/۱	CFA+anti-IL-6(W):
-۴/۴±۰/۱	-۳/۶±۰/۴		
+++ ####	++ ####	۰/۴±۰/۲	anti-IL-
-۴/۸±۰/۲	-۴±۰/۲		6(D):

هایپرآلتزی در موش صحرابی‌های تیمار شده با CFA در روزهای ۱۴ و ۲۱ بعد از نزیرینق نسبت به روزهای نخست مطالعه کاهش نشان داد. داده‌ها به صورت میانگین \pm SEM نشان داده شدند.^{۰/۰۵} $P=$ ^{۰/۰۱} $*P=$ ^{۰/۰۰۱} $**P=$ ^{۰/۰۰۰۱} $***P=$ ^{۰/۰۰۰۰۱} مقایسه تغییرات هایپرآلتزی بین روز صفر و روزهای دیگر مطالعه. $++P=$ ^{۰/۰۰۱} $+++P=$ ^{۰/۰۰۰۱} تفاوت بین هایپرآلتزی در گروه CFA و گروه anti-IL-6 در زمان متناسب.

تغییرات سطوح سرمی IL-6 در طی مراحل مختلف AA:

تزریق CFA باعث افزایش معنی دار سطوح سرمی IL-6 در روزهای ۱۴ و ۲۱ بعد از تزریق CFA در مقایسه با روز صفر شد ($P=0.001$). درمان با آنتی بادی anti-IL-6 نیز باعث کاهش سطوح IL-6 (نردهای سطح پایه ای IL-6 روز صفر) شد. همچنین، سرمی IL-6 درمان روزانه یا هفتگی گروه AA با آنتی بادی anti-IL-6 باعث کاهش معنی دار سطوح سرمی IL-6 در روزهای ۱۴ و ۲۱ در مقایسه با گروه کنترل AA شد ($P=0.01$). تفاوت مشخصی بین گروههای نیمار شده به صورت هفتگی و روزانه وجود نداشت. در ضمن، گروههای تیمار شده با CFA+PBS تفاوت معنی داری را در سطوح IL-6 نشان ندادند (حدول شماره ۳).

جدول شماره ۳- تغییرات سطوح سرمی IL-6 در طی مراحل مختلف AA در گروههای مورد مطالعه

روزهای مطالعه				
۲۱	۱۴	*		
۷۶۰±۲۵ ***	۵۸۷±۲۰ ***	•±۱۲	CFA	گروه- ماهی
۷۳۰±۲۰ ***	۵۰۰±۱۷ ***	•±۱۱	CFA+PBS	
۳۵۰±۱۷ ####	۲۳۳±۱۹ ####	•±۱۳	CFA+anti- IL-6(W):	مطالعه
•±۱۰ ####	•±۱۲ ####	•±۱۱	anti-IL- 6(D):	

سطوح سرمی-IL-6 در طی مراحل مختلف AA افزایش یافت. درمان با آنتی بادی anti-IL-6 به صورت روزانه و هفتگی در طول AA باعث کاهش مشخص سطح سرمی-IL-6 شد. داده‌ها به صورت میانگین \pm SEM ارایه شده است.

*** $P=0.001$ افزایش سطح سرمی-IL-6 در طی مراحل مختلف AA در مقایسه با روز صفر. ##### $P=0.001$ مقایسه بین سطوح سرمی-IL-6 بین گروههای CFA+anti-IL-6 و CFA ها،

نگیریات بیان mOR نخاعی در طی مراحل مختلف AA: وسترن بلات باندهای پروتئینی mOR با وزن مولکولی ۴۸ kDa در همه نمونه‌های بدست آمده از نخاع تمام گروههای بیکسان ۴۸ در

موش صحرائی‌های گروه AA به طور معنی‌داری حجم پا را در همه روزهای بررسی کاهش داده است. این اثر ممکن است به دلیل نقش تحریکی IL-6 بروی سلول‌های اندوتیالی، دگرانوله شدن مونوцит‌ها و آزادسازی پروتئین‌های مونوپوتی باشد؛ چراکه بیان این مولکول‌های بنیادی در ایجاد علائم التهابی نقش موثری دارد [۱۹] و می‌توان با بلوك کردن این مسیر به وسیلهٔ anti-IL-6 این علائم را درمان کرد. برخی بررسی‌ها نیز بیان‌گر کاهش پیشرفت آرتربیت ایجاد شده به وسیلهٔ عامل التهابی کاراژینان در موش‌های درمان شده با آنتی‌بادی anti-IL-6 می‌باشد [۲۰]. با وجود اینکه درمان با آنتی‌بادی anti-IL-6 طی این مطالعه باعث کاهش حجم پا در موش صحرائی‌های AA شد، ولی همان‌گونه که در نتایج اشاره گردید باعث حذف کامل ادم پا نگردید، بدنه‌ی که پای مزبور در انتهای درمان نسبت به روز صفر حجم بیشتری داشت. آنچه که در این زمینه می‌توان اشاره کرد، این است که میانجی‌های مختلفی مانند هیستامین، برادی‌کینین و سایتوکاین‌های مانند، TNF α و IL-1,6 در جریان بروز ادم طی التهاب موثر هستند [۱۰]. بنابراین به نظر می‌رسد که مهار یکی از آنها به‌نهایی باعث حذف کامل ادم پا نگردد. از دیگر نتایج این بود که بیان در روزهای ۱۴ و ۲۱ بعد از ایجاد AA هم‌زمان با کاهش هایپرآلرژی، افزایش می‌یابد. این یافته‌ها در تأیید مطالعات قبلی ما، که نالوکسان به‌عنوان آنتاگونیست mOR دارای اثرات هایپرآلرژیک در روز ۲۱ AA بود، نشان داد که mOR نخاعی در کاهش هایپرآلرژی در طی فاز مزمن (فاز آرتربیتی) AA نقش موثری دارد [۸]. عوامل مختلف محیطی و مرکزی در انتقال از فاز حاد به فاز مزمن التهاب دخیل می‌باشند و هنوز مکانیسم‌های مختلف تاثیر این عوامل درگیر در تغییرات علائم التهابی به‌طور کامل شناسایی نشده‌اند [۲۱]. الگوی تولید و ترشح سایتوکاین‌ها در پاسخ‌های حاد و مزمن در شرایط مختلف التهابی متفاوت است. سایتوکاین IL-6 می‌باشد که در انتقال از مرحله حاد به مزمن التهاب است و در مراحل مختلف RA نقش بسیار مهمی دارد [۶]. بعضی مطالعات نشان داده‌اند که IL-6 اثرات التهابی، در التهاب مزمن ایجاد شده به وسیلهٔ کاراژینان داشته و باعث هایپرآلرژی می‌شود [۲۰]. اما نتایج این مطالعه اثرات ضد التهابی IL-6 را در طی فاز مزمن AA نشان داد. مصرف آنتی‌بادی anti-IL-6 (به‌صورت روزانه و هفتگی) باعث کاهش بیان mOR در طی فاز مزمن AA و متعاقباً باعث افزایش هایپرآلرژی شد. البته این یافته‌های متفاوت در اثرات هایپرآلرژیک IL-6 در طی التهاب مزمن می‌تواند مربوط به زمان‌های مختلف مطالعه التهاب و روش‌های متفاوت سنجش سطوح IL-6 باشد. به علاوه نتایج ما و نتایج بدست آمده از مطالعات پیشین نشان

اثرات درمان با آنتی‌بادی anti-IL-6 بر روی بیان mOR نخاعی در طی مراحل مختلف AA: تیمار روزانه و یا هفتگی با anti-IL-6 باعث کاهش بیان پروتئین mOR نخاعی به‌صورت وابسته به زمان شد. مصرف آنتی‌بادی anti-IL-6 موجب کاهش معنی‌دار در میزان بیان پروتئین mOR در روزهای ۱۴ ($11/9 \pm 2/1$ ٪) و ۲۱ ($8/5 \pm 1/8$ ٪) در مقایسه با گروه کنترل AA شد ($P=0.001$). ولی با این وجود بیان mOR در روزهای ۱۴ و ۲۱ به‌طور مشخصی بالاتر از روز صفر بود ($P=0.01$). تفاوت معنی‌داری در میزان بیان mOR در گروه‌هایی که به‌صورت روزانه و یا هفتگی با anti-IL-6 تیمار شده بودند در روزهای مختلف مطالعه وجود نداشت. آنالیزهای آماری نشان داد که مقدار بیان پروتئین mOR نخاعی در طی درمان anti-IL-6 با روز ۲۱ در مقایسه با گروه کنترل AA کاهش یافته و کمتر از روز ۱۴ است ($P=0.01$). مصرف PBS در موش صحرائی‌های AA تغییری را در میزان بیان mOR در مقایسه با گروه AA ایجاد نکرد (شکل شماره ۲).

بحث

مطالعه حاضر نشان داد که یکی از مسیرهای مهم افزایش اثر آگونیست‌های اپیوئیدی در شرایط التهابی، افزایش بیان mOR نخاعی تحت تاثیر میانجی‌های آزاد شده است. از مهم‌ترین میانجی‌های التهابی می‌توان به سایتوکاین‌های IL-1, IL-6 IL-10 و TNF α اشاره کرد [۹]. مطالعات نشان داده‌اند که، سایتوکاین‌ها نقش مهمی را به‌وسیلهٔ افزایش بیان mOR در سیستم عصبی مرکزی و بافت‌های محیطی ایفا می‌کنند. IL-6 سایتوکاینی با تاثیر دوگانه ضد التهابی و تقویت‌کننده التهاب است [۱۰]. بررسی‌های قبلی حاکی از نقش موثر IL-6 در هر دو مرحله حاد و مزمن بیمارهای التهابی است [۱۰]. مطالعه ما نیز نشان داد که مقادیر سرمی 6 IL-6 طی التهاب ناشی از افزایش یافته و تا روز ۲۱ بعد از AA در سطح بالایی باقی می‌ماند. بررسی‌ها حاکی از ارتباط نزدیک بین افزایش سطوح سرمی 6 IL-6 و القاء بیماری‌های التهابی مانند آرتربیت روماتوئید و کرون می‌باشد [۹]. هم‌چنین، نشان داده شده است که ارتباط مشخصی بین سطوح 6 IL-6 و سایر مارکرهای مختلف التهابی طی بیماری‌ها وجود دارد. با این وجود اثرات متغیر 6 IL-6 طی شرایط مختلف بر فعالیت سیستم عصبی هنوز کاملاً تعریف شده نمی‌باشد [۱۸]. مطالعه ما نشان داد که سطوح سرمی 6 IL-6 به‌صورت وابسته به زمان در تغییرات هایپرآلرژی طی مراحل مختلف AA موثر می‌باشد. نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان داد که تجویز آنتی‌بادی anti-IL-6 در

anti-IL-6 را نشان دهد. این مطالعه اهمیت ارتباط واپسی به زمان بین سطوح سرمی IL-6 و التهاب ایجاد شده به وسیله CFA را نشان داد.

نتیجه‌گیری

در مجموع می‌توان گفت که افزایش سطح سرمی IL-6 در طی فاز مزمن (آرتربیتی) بیماری، باعث کاهش هایپرآلرژی ناشی از mOR می‌گردد، که ممکن است به وسیله افزایش بیان IL-6 در بروز علائم بیماری‌های التهابی، مهار IL-6 ممکن است یک روش جدید برای کاهش علائم التهاب به ویژه هایپرآلرژی باشد. به‌نظر می‌رسد که برای نیل به اثرات درمانی ضد دردی مناسب طی تجویز داروی آنتی‌سایتوکاینی anti-IL-6، مرحله بیماری التهابی نظیر آرتربیت روماتوید نیز باید در نظر گرفته شود. بررسی‌های بیشتر برای تعریف مناسب نحوه استفاده بالینی این آنتی‌سایتوکاین موثر در التهاب آرتربیتی پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه به عنوان طرح تحقیقاتی مصوب در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام پذیرفته است.

داد که مصرف IL-6 در یک هفته بعد از تزریق CFA به کف پای موسه‌های صحرایی به سرعت باعث ایجاد بی‌دردی می‌شود (5 min) که به وسیله نالوکسان بلوک شده بود [7]. آنالژی در طی التهاب با آزادسازی اوپیوئیدهای درونی آزاد شده به وسیله سلول‌های ایمنی بعد از تغییر در سطوح IL-6 مرتبط است. بعضی مطالعات نشان داده‌اند که IL-6 می‌تواند باعث افزایش بیان mOR, mRNA در سلول‌های نوروبلاست انسانی (SH SY5Y cells) شود [7]. هم‌چنین، پیشنهاد می‌شود که IL-6 می‌تواند به عنوان تبدیل‌کننده دردهای التهابی و عضو کلیدی مسیر ارتباط سیستم ایمنی-اپیوئیدی در نظر گرفته شود [4]. بنابراین انتظار می‌رود که حداقل قسمتی از اثرات آنتی‌هایپرآلرژیک IL-6 سرمی در طی فاز مزمن (آرتربیتی) AA به وسیله افزایش بیان mOR نخاعی میانجی گری شود. نتایج ما هم‌چنین نشان داد که مصرف روزانه یا هفتگی دوز خشی کننده آنتی‌بادی anti-IL-6 (0/1 µg/ml) در کاهش سطوح افزایش یافته IL-6 سرمی در طی AA موثر است و تفاوت مشخصی بین تزریق روزانه و یا هفتگی آن وجود نداشت. با توجه به عدم تفاوت نتایج تزریق روزانه و هفتگی Anti-IL-6 در این مطالعه می‌تواند به نظر می‌رسد که حداکثر آستانه فعالیت anti-IL-6 ممکن است نزدیک و یا حتی پایین‌تر از دوز 0/1 µg/ml در هر هفته باشد، و مطالعه حاضر نمی‌تواند علی‌رغم مشاهده کاهش مشخص در پارامترهای بیماری، نتایج فارماکوکیتیک مرتبط با اثرات درمان با آنتی‌بادی

References:

- [1] Cicala C, Ianaro A, Fiorucci S, Calignano A, Bucci M, Gerli R, et al. No-naproxen modulates inflammation, nociception and downregulates T cell response in rat freunds adjuvant arthritis. *Br J Pharmacol* 2000; 130(6): 1399-405.
- [2] Taniguchi N, Kanasi S, Kawamoto M, Endo H, Higashino H. Study on application of static magnetic field for adjuvant arthritis rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2004; 1(2): 187-91.
- [3] Tekieh E, Zaringhalam J, Manaheji H, Maghsoudi N, Alani B, Zardooz H. Increased serum IL-6 level time- dependently regulates hyperalgesia and spinal MU opioid receptor expression during CFA- induced arthritis. *EXCLI J* 2011; 10: 23-33.
- [4] De Jongh RF, Vissers KC, Meert TF, Booij LH, De Deyne CS, Heylen RJ. The role of interleukin-6 in nociception and pain. *Anesth Analg* 2003a; 96(4): 1096-103.
- [5] Zhang Q, Schäffer M, Elde R, Stein C. Effects of neurotoxins and hindpaw inflammation on opioid receptor immunoreactivities in dorsal root ganglia. *Neuroscience* 1998; 85(1): 281-91.
- [6] Nishimoto N, Kishimoto T. Interleukin 6: from bench to bedside. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006; 2(11): 619-26.
- [7] De Jongh RF, Vissers KC, Booij LH, De Jongh KL, Vincken P, Meert TF. Interleukin-6 and perioperative thermoregulation and HPA-axis activation. *Cytokine* 2003b; 21(5): 248-56.
- [8] Zaringhalam J, Manaheji H, Mghsoodi N, Farokhi B, Mirzaee V. Investigation of the relation between the hypothalamus-pituitary-adrenal axis, IL-6 and hyperalgesia during rheumatoid arthritis in male rats. *Physiol Pharmacol J* 2007; 11(2): 130-6. [in Persian]
- [9] Van Snick J. Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol* 1990; 8: 253-78.
- [10] Möller B, Villiger PM. Inhibition of IL-1, IL-6, and TNF-alpha in immune-mediated Inflammatory disease. *Springer Semin Immunopathol* 2006; 27(4): 391-408.
- [11] Zaringhalam J, Akbari A, Tekieh E, Manaheji H, Rezazadeh S. Achillea santolina reduce serum interlukine-6 level and hyperalgesia during CFA-induced inflammation in male Wistar rats. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 2010; 8(12): 1180-9.
- [12] Pol O, Puig MM. Expression of opioid receptors during peripheral inflammation. *Curr Top Med Chem* 2004; 4(1): 51-61.

- [13] Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain on conscious animals. *Pain* 1983; 16(2): 109–10.
- [14] Agarwal S, Misra R, Aggarwal A. Induction of metalloproteinases expression by TLR ligands in human fibroblast like synoviocytes from juvenile idiopathic arthritis patients. *Indian J Med Res* 2010; 131: 771-9.
- [15] Back SK, Lee J, Hong SK, Na HS. Loss of spinal μ -opioid-receptor is associated with mechanical allodynia in a rat model of peripheral neuropathia. *Pain* 2006; 123(1-2): 117-26.
- [16] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248–54.
- [17] Liang B, Song Z, Wu B, Gardner D, Shealy D, Song XY, et al. Evaluation of anti-IL-6 monoclonal antibody therapy using murine type II collagen-induced arthritis. *J Inflamm (Lond)* 2009; 6: 10.
- [18] Leon LR. Cytokine regulation of fever: studies using gene knockout mice. *J Appl Physiol* 2002; 92(6): 2648-55.
- [19] Lipsky PE. Interleukin-6 and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 2006; 8 Suppl 2: S4.
- [20] Takagi N, Miura M, Moriya Y, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, et al. Blockage of interleukin-6 receptor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 1998; 41(12): 2117-21.
- [21] Vadivelu N, Sinatra R. Recent advances in elucidating pain mechanisms. *Curr Opin Anaesthesiol* 2005; 18(5): 540–7.