Original Article

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

Tekieh E[1], Zaringhalam J[1*], Manaheji H[1], Zeinalzadeh E[2]

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.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2022-06-25]

تاثیر سطوح سرمی اینترلوکین-۶ بر روی هایپرآلژزی و بیان گیرنده‌های اوپیوئیدی Mu نخاعی در طی التهاب مزمن ایجاد شده به‌وسیله‌ی ادجوانت کامل فروند

الهه تکیه[۱]، جلال زرین قلم[۱*]، هما مناهجی[۱]، الناز زینال زاده[۲]

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 هایپرآلژزی، ادم و تغییرات بیان گیرنده‌های اوپیوئیدی مو نخاعی در طی مراحل مختلف آرتریت مزمن (AA) ناشی از تزریق CFA (Complete Freund's Adjuvant)، در موش‌های صحرایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه کاربردی- بنیادی، آرتریت به‌وسیله‌ی یک‌بار تزریق کف پایی CFA در موش‌های صحرایی ایجاد شده و به ٤ گروه، و هر گروه به سه زیرگروه ٦ 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 به‌وسیله‌ی تکنیک وسترن بلاتینگ تعیین شد.

نتایج: تیمار روزانه با آنتی‌بادی anti-IL-6 به‌طور مشخصی باعث کاهش ادم پا در گروه AA در مقایسه با گروه کنترل AA شد (P=۰/۰۰۱)، درحالی‌که تزریق روزانه و هفتگی anti-IL-6 هایپرآلژزی را در گروهایی که با آنتی‌بادی تیمار شده بودند، در روزهای ١٤ و ۲۱ به‌طور مشخصی افزایش داد (به‌ترتیب، P=۰/۰۰۱، P=۰/۰۱). آنتی‌بادی IL-6 به‌صورت وابسته به زمان باعث افزایش هایپرآلژزی و کاهش مشخص بیان mOR (به‌ترتیب، P=۰/۰۱، P=۰/۰۰۱) در طی تیمار با آنتی IL-6 در روزهای ١٤ و ۲۱ بعد از تزریق CFA شد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه اهمیت ارتباط وابسته به زمان بین سطوح سرمی IL-٦ و هایپرآلژزی طی آرتریت مزمن را نشان داده و نتایج آن پیشنهاد می‌کند که طی درمان‌های ضد التهابی با داروهای ضد سایتوکاینی مانند anti-IL-6 توجه به مرحله بیماری التهابی آرتریت روماتویید بسیار مهم است.

واژگان کلیدی: اینترلوکین-٦، هایپرآلژزی، التهاب، ادجوانت کامل فروند

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره شانزدهم، شماره ۳، مرداد و شهریور ۱۳۹۱، صفحات ۲۰٤-۱۹٦

مقدمه

تزریق کف پایی Complete Freund's Adjuvant (CFA) باعث ایجاد آرتریت (AA) در موش‌های صحرایی می‌شود که شباهت بسیاری به آرتریت روماتوئید (AA) در انسان دارد [۱]. این مدل به‌عنوان یک مدل مونوآرتریتی به‌طور گسترده‌ای در تحقیقات دارویی و مولکولی استفاده می‌گردد. التهاب و علائم آن نتیجه‌ی افزایش سریع ترشح میانجی‌های التهابی شامل کموکاین‌ها و سایتوکاین‌هایی مانند اینترلوکین‌های ۱ و ٦ (IL-1 & IL- 6) و فاکتور نکروز دهنده تومور α (TNF) است [۳،۲]. میانجی‌های 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.

مطالعات بسیاری اهمیت سایتوکاین‌ها را در دردهای مزمن نشان داده‌اند [٥،٤]. در مطالعات قبلی نشان داده شده است که تزریق موضعی CFA در موش‌های صحرایی باعث افزایش ترشح سیستمیک و موضعی سایتوکاین‌هایی مثل IL-1,IL-6 و TNFα می‌شود [۳]. IL-6 سایتوکاینی با توانایی‌های مختلف است که در ابتدا به‌عنوان یک فاکتور تمایز یافته از T-cell و B-cellها 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 [٦]. باتوجه به اثرات تحریکی متعدد IL-6 برروی سلول‌های سیستم ایمنی و سلول‌های اندوتلیال رگی این اعتقاد وجود دارد که IL-6 نقش پاتوژنیک مهمی را در پیشرفت التهاب که منجر به هایپرآلژزی و ادم می‌شود، ایفا می‌کند [۷]. مطالعه قبلی ما نیز نشان داد که هایپرآلژزی ایجاد شده به‌وسیله‌ی CFA تا روز ۷ بعد از تزریق ادامه پیدا می‌کند که با افزایش مدیاتورهای التهابی به‌ویژه IL-6 مرتبط است [۸]. میانجی‌گری 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-

[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 **دورنویس:** ۰۲۱ ۲۲۴۳۹۹۷۱

پست الکترونیک: jzaringhalam@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۲۷ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۰/۱۲/۴

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2022-06-25]

کند؛ به‌طوری‌که مهار آن روشی جدید برای درمان التهاب‌های مزمن به‌شمار می‌رود [۹]. هم‌چنین مطالعات ثابت کرده‌اند بعضی از علایم التهابی آرتریت روماتوئید با این سایتوکاین (IL-6) در ارتباط بوده و می‌توان آرتریت روماتوئید را به‌وسیله‌ی 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 اوپیوئیدی درونی باعث ایجاد بی‌دردی در مدل‌های حیوانی التهاب می‌شود، که البته این حالت نیز به‌عنوان یک پاسخ تعدیلی اندوژن در روند التهاب محیطی محسوب می‌شود [۱۰]. مطالعات قبلی ما حاکی از تداوم ۲۱ روزه هایپرآلژزی در سه هفته بعد از تزریق CFA می‌باشد. در آن مطالعه نشان داده شد که هایپرآلژزی پای درگیر از هفته دوم به بعد کاهش نشان می‌دهد [۱۱]. در ادامه با توجه به نقش مهم اپیوئیدها در کاهش درد طی التهاب در شرایط مختلف بالینی و آزمایشگاهی، بررسی‌های بیشتر حاکی از افزایش بیان گیرنده‌های اپیوییدی مو نخاع طی التهاب بود که می‌توانست توجیه مناسبی بر اثرات ضد دردی اوپیوئیدهای 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 عمده IL-6 در طی التهاب و تاثیر آن بر روی بیان گیرنده‌های مرتبط با درد، به‌ویژه گیرنده‌های اوپیوئیدی mu و استفاده از آنتی‌سایتوکاین‌ها برای درمان بیماری‌های التهابی در تحقیقات اخیر، این مطالعه به‌منظور روشن شدن بیشتر اثرات IL-6 در هایپرآلژزی و ادم در طی مراحل مختلف آرتریت مزمن ایجاد شده به‌وسیله CFA و بررسی اثرات درمان با آنتی IL-6 برروی بیان mOR نخاعی طراحی گردید.

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی:

در این آزمایش از ۷۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با میانگین وزنی ۱۸۰-۲۰۰ گرم استفاده شد که به ٤ گروه اصلی (۱: گروه CFA، ۲: گروه CFA+PBS، ۳: گروه Anti IL-6+CFA (تزریق روزانه)، ٤: گروه CFA Anti IL-6+ (تزریق هفتگی)، تقسیم شدند. هر گروه به‌نوبه خود به ۳ زیر گروه (شامل روزهای ۰، ١٤ و ۲۱) تقسیم شده و برای هر زیر گروه ٦ سر موش در نظر گرفته شد. حیوانات در قفس‌های پلی‌پروپیلن در شرایط استاندارد (۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ٦۰-۷۰ 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:

التهاب به‌وسیله‌ی تزریق زیر جلدی (۱۰۰ µl) CFA (مایکوباکتریم توبرکلوزیس تضعیف شده) حل شده در روغن معدنی استریل (Sigma, St Louis, MO, USA) با دوز 10 mg/ml به کف پای راست حیوانات در روز صفر ایجاد شد. موش‌های کنترل فقط روغن معدنی استریل (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 (آرتریتی حاد) و هفته دوم و سوم را تحت عنوان فاز مزمن آرتریتی در نظر می‌گیرند [۳-۱].

سنجش ادم پا:

برای تایید سنجش تزریق صحیح CFA، حجم هر پا قبل و بعد از تزریق در طی زمان‌های متفاوت مورد سنجش قرار گرفت. سنجش حجم پا به‌وسیله‌ی جابه‌جایی یک محلول الکترولیتی در پلتیسمومتر (model 7141; Ugo Basile; Comerio VA, Italy) انجام شد. به‌طور خلاصه، پای موش‌های صحرائی درون یک محفظه‌ی شفاف حاوی محلول الکترولیتی شفاف فرو برده شده و حجم مایع جابه‌جا شده که با حجم پا برابر است به‌وسیله‌ی یک نشان‌گر دیجیتال نمایش داده شد. اندازه‌گیری حجم برای هر پا دوبار انجام شده و میانگین آنها محاسبه شد. مقدار ادم به‌وسیله سنجش تفاوت حجم پا بین روز صفر و زمان‌های مختلف محاسبه شد و حجم اندازه‌گیری شده به‌وسیله‌ی درصد حجم نسبت به روز صفر گزارش گردید.

سنجش هایپرآلژزی حرارتی:

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

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2022-06-25]

در اتاقک‌های پلکسی گلاس به‌مدت ۱۵-۱۰ دقیقه قبل از آزمایش قرار داده شدند تا به محیط آزمایش عادت کنند. عقب کشیدن پا به‌طور اتوماتیک به‌وسیله‌ی تایمر دیجیتال که به یک منبع حراموش صحرائیی متصل است، ثبت شد. در این روش بخش میانی کف پای حیوان در معرض اشعه مادون قرمز نقطه‌ای قرار گرفته و زمان تاخیر در پس کشیدن پا ثبت می‌گردد. PWL ۳ بار برای هر پا در یک فاصله زمانی ۱۰-۵ 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 به‌دست آمده در صوموش صحرائی منفی بودن نشان‌دهنده هایپرآلژزی در پای مورد نظر بود [۳].

سنجش سطوح IL-6 سرمی در نمونه‌های خونی:

نمونه خونی از عروق موش صحرائیرواوربیتال گوشه چشم حیوانات بیهوش شده با ایزوفلوران و به‌وسیله‌ی لوله موین هپارینه تهیه شد. نمونه‌های اخذ شده، سانتریفیوژ گردیده و سرم حاصل در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد (در نمونه‌گیری از تمامی گروه‌ها سعی بر آن بود که نمونه‌گیری در حدود ۸ تا ۸:۱۵ دقیقه صبح انجام شود). سطوح سرمی IL-6 به‌وسیله‌ی کیت ELISA استاندارد موش صحرائی (Bender Med System, Uk) و براساس دستورالعمل کیت سنجیده شد. محدوده‌ی سنجش حدود ۱۳/۲ pg/ml بود.

تجویز آنتی بادی Anti Il-6:

برای سنجش نقش IL-6 در ایجاد علائم AA، به‌منظور کاهش سطوح سرمی IL-6، حیوانات با آنتی‌بادی anti-IL-6 تیمار شدند. آنتی‌بادی IL-6 توسط سیستم‌های R&D (Abcam/Uk) تهیه شد. این آنتی‌بادی با تزریق E-coli حاوی ژن IL-6 موش صحرایی به بز از مسیر نوترکیبی توسط Abcam تهیه گردیده بود. بعضی مطالعات، فعالیت موثر این آنتی‌بادی نوترکیب را در موش صحرایی نشان داده‌اند [١٤]. نظر به این مطالعات و طبق دستورعمل کارخانه تولیدکننده (catalogue number ab9770)، دوز خنثی‌کننده (ND_{50}) برای آنتی‌بادی anti-rat IL-6 توام با غلظت 0.1 ng/ml rat IL-6، 0.003-0.005 µg/ml در این مطالعه، در نظر گرفته شد. آنتی‌بادی تخلیص شده‌ی IL-6 در محلول PBS برای تزریق داخل صفاقی رقیق شده و گروه کنترل فقط PBS دریافت کردند. این محلول به‌صورت تازه و ۳۰ دقیقه قبل از تزریق تهیه گردید.

سنجش بیان mOR نخاعی با تکنیک Western blotting:

بعد از تست‌های رفتاری، برای سنجش میزان بیان mOR در نخاع از روش وسترن بلات استفاده شد [۱۵]. موش‌های صحرائی با استفاده از ایزوفلوران بیهوش شده و نخاع آنها به‌سرعت خارج شده و در یخ گذاشته قرار گرفت، سپس در بافر استخراج محتوی مخلوط مهارکننده پروتئیناز (50mM Tris-HCl, PH7.5,150 mM NaCl, 1 mM ethylenediamin-etetraacetic acid (EDTA), 1% NP40, 0.5 % sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 mM sodium orthovanadate, 2.5 µg/ml aprotinin, 2 µg/ml leupetin, 2 µg/ml pepstatin A) با دور ۲۰۰۰۰ برای مدت ۳۰ ثانیه هموژنیزه شدند (Brinkman Polytron Homogenizer). نمونه‌ها در سانتر-یفیوژ با دور ۱۰۰۰۰ در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. محلول رویی برای سنجش غلظت پروتئین جدا شد [١٦]. مقدار مساوی از پروتئین‌ها (٦٠µg) برای ترکیب شدن با loading buffer (4 % SDS,25 mM Tris–HCl pH 6.8, 5 % glycerol,0.5 % 2-mercaptoethanol, 0.005 % bromophenolblue) جدا گردید. نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شده و به‌مقدار مساوی (µl ۱۲) در ژل پلی-اکریل آمید (Pager Gels10 % Tris-Glycine, Bio-Rad) و به‌روش الکتروفورز برای ٦٠ دقیقه با ولتاژ ۱۲۰V از هم جدا شدند. پروتئین‌ها با استفاده از (miniprotean II (Bio-Rad، در ولتاژ V ۱۰۰ به‌مدت ۸۵ دقیقه از روی ژل بر روی کاغذ PVDF (Millipore, Bedford, MA) منتقل شدند. سایت‌های غیر اختصاصی موجود بر کاغذ به‌وسیله‌ی انکوباسیون با بافر بلاکینگ (0.2% Aurora BlockingReagent; 1X Phosphate Buffered Saline:0.058 M Na2HPO4, 0.017 M NaH2PO4,0.068 M NaCl; 0.05 % Tween-20 from ICNBiomedicals, Costa Mesa, CA) به‌مدت ۹۰ دقیقه در دمای ٢٤ درجه پوشانده شده و سپس به‌مدت یک‌ساعت در دمای ٢٤ درجه با آنتی‌بادی اولیه محلول در بافر بلاکینگ (Rabbit polyclonalIgG for mOR (1:1000); Abcam/CA)، کاغذها دوباره با بافر بلاکینگ شستشو داده شده و سپس با آنتی‌بادی ثانویه (Anti-rabbit IgG (1:10000), abcam/CA) محلول در بلاکینگ به‌مدت یک‌ساعت در دمای ٢٤ درجه انکوبه شدند. کاغذها ۳ بار با بافر بلاکینگ شسته شدند. فعالیت پروتئین‌ها با استفاده از سیستم ظهورگر کمی‌لومینسانس (ECL, Amersham)، تشخیص داده شد. کاغذها با محلول stripping (2-100 µM mercaptoethanol,2 % SDS, 62.5 mM Tris [pH 6.7]) به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه و با آنتی‌بادی اولیه beta-actin (1:5000; Cell Signaling) به‌عنوان یک نمونه کنترل انکوبه شدند. تراکم باندها به‌وسیله‌ی نرم افزار سنجش تراکم NIH

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2022-06-25]

Image(1.60), سنجیده شد و به‌صورت نسبت تراکم mOR به تراکم β-actin بیان شد.

طراحی مطالعه:

AA به‌وسیله‌ی 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 خنثی anti-IL-6 محلول در PBS (0.1 μg/ml) تهیه شده و از روز اول بعد از تزریق CFA به‌مدت ۲۱ روز به‌صورت داخل صفاقی به دو ترتیب روزانه و یا هفتگی تزریق شد [۱۷،۱٦]. بررسی‌های مولکولی، رفتاری، سنجش حجم پا و سطح سرمی IL-6 در روز صفر (قبل از تزریق CFA) و ١٤ و ۲۱ (فاز آرتریتی)، ۳۰ دقیقه قبل از تزریق آنتی‌بادی انجام شد. میزان بیان گیرنده‌های مو نخاعی به‌وسیله‌ی وسترن بلاتینگ در روزهای ۰، ١٤ 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 متوکسی فلوران بیهوش شده و با استفاده از گردن زدن کشته شده، نخاع آنها به‌طور کامل خارج گردید و ابتدا در نیتروژن مایع سپس در دمای ۸۰- فریز شدند تا میزان بیان گیرنده‌های mu نخاعی به روش وسترن بلات مورد سنجش قرار گیرد.

آنالیزهای آماری:

نتایج به‌صورت میانگین±انحراف از معیار استاندارد (SEM) گزارش شدند. آزمایشات وسترن بلات در دو یا سه زمان مورد بررسی قرار گرفت و نتایج به‌وسیله‌ی آزمون unpaired t-test آنالیز شد. بررسی‌های درون‌گروهی هایپرآلژزی حرارتی، ادم و سطوح سرمی IL-6 با استفاده از ANOVA یک‌طرفه و برای نیل به نتایج دقیق‌تر از post hoc Tukey's استفاده شد. در بررسی‌های بین گروهی نیز برای دقت بیشتر از Unpaired t-test استفاده شد. $P<۰/۰۵$ به‌معنی 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) شد که تا روز ۲۱ مطالعه ادامه پیدا کرد. حجم پا در روز ۲۱ در مقایسه با روز صفر بیشتر بود (P=۰/۰۰۱). تزریق روزانه و هفتگی آنتی‌بادی IL-6 در گروه AA باعث کاهش حجم پا در مقایسه با گروه کنترل AA شد (P=۰/۰۰۱). هم‌چنین، لازم به‌ذکر است که علی‌رغم کاهش ادم پا در روزهای ١٤ و ۲۱ به‌دنبال تجویز آنتی-بادی 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، (PBS) وجود نداشت (جدول شماره ۱).

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

		روزهای مطالعه		
		۰	١٤	۲۱
گروه-های مطالعه	CFA	۰±۱/۲	۷٤±۱/٤ ***	۸۷±۱/۱ ***
	CFA+PBS	۰±۱/۱	۷۵±۱/۵ ***	۸۹±۱ ***
	CFA+anti-IL-6(W):	۰±۲	۳۷±۲/٦ ###	۳٦/۵±۲/۱ ###
	anti-IL-6(D):	۰±۲/۱	۳۵±۲/۵ ###	۳٤/۱±۲/۳ ###

تزریق CFA موجب ایجاد ادم در پای تزریق شده گردید که تا روز ۲۱ بعد از تزریق ادامه داشت و درمان با آنتی بادی Anti-IL-6 باعث کاهش حجم پا شد. داده‌ها به‌صورت میانگین±SEM نشان‌داده شده‌اند. ***P=۰/۰۰۱: افزایش معنی‌دار حجم پا تزریق شده را در طی روزهای مختلف مطالعه در مقایسه با روز صفر. ###P=۰/۰۰۱: مقایسه تفاوت حجم پا بین موش صحرائی های تیمار شده با CFA و گروه تیمار شده با CFA+anti–IL-6.

تغییرات هایپرآلژزی حرارتی در طی مراحل مختلف AA :

هایپرآلژزی حرارتی ایجاد شده در پای چپ در طی مراحل مختلف AA متفاوت بود. سنجش PWL در گروه AA نشان داد که هایپرآلژزی، بعد از تزریق CFA به‌طور معنی‌داری در روز ١٤ و ۲۱ در مقایسه با روز صفر (P=۰/۰۱، P=۰/۰۵) و در روز ۲۱ نیز در مقایسه با روز ١٤ کاهش داشته است (P=۰/۰۰۱). گروه‌های آزمایشی تیمار شده با آنتی‌بادی افزایش معنی‌داری را در هایپرآلژزی در روزهای ١٤ و ۲۱ در مقایسه با گروه کنترل AA نشان دادند (P=۰/۰۰۱، P=۰/۰۱). تفاوت معنی‌داری در هایپرآلژزی گروه‌های مورد مطالعه طی تیمار روزانه و هفتگی آنتی‌بادی anti-IL-6 وجود نداشت. هم‌چنین تفاوت مشخصی در هایپرآلژزی در طی فازهای مختلف AA بین گروه CFA و گروه vehicle+CFA، وجود نداشت (جدول شماره ۲).

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2022-06-25]

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

		روزهای مطالعه		
		۰	١٤	۲۱
گروه‌های مطالعه	CFA	۰/۷±۰/۱	-۲/٤±۰/۳ **	-۰/۸±۰/٤ *
	CFA+PBS	۰/۲±۰/۱	-۲/٦±۰/۲ **	-۰/۹±۰/۳ *
	CFA+anti-IL-6(W):	۱/۱±۰/۱	++ ### -۳/٦±۰/٤	+++ ### -٤/٤±۰/۱
	anti-IL-6(D):	۰/٤±۰/۲	++ ### -٤±۰/۳	+++ ### -٤/۸±۰/۲

هایپرآلژزی در موش صحرایی‌های تیمار شده با CFA در روزهای ١٤ و ۲۱ بعد از تزریق نسبت به روزهای نخست مطالعه کاهش نشان داد. داده‌ها به‌صورت میانگین± SEM نشان داده شده‌اند. *P=۰/۰۵، **P=۰/۰۱: مقایسه تغییرات هایپرآلژزی بین روز صفر و روزهای دیگر مطالعه. ++P=۰/۰۱. +++P=۰/۰۰۱ تفاوت بین هایپرآلژزی در گروه CFA و گروه CFA+anti –IL-6 در زمان متناسب.

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

تزریق CFA باعث افزایش معنی‌دار سطوح سرمی IL-6 در روزهای ١٤ و۲۱ بعد از تزریق CFA در مقایسه با روز صفرشد (P=۰/۰۰۱). درمان با آنتی‌بادی anti-IL-6 نیز باعث کاهش سطوح سرمی IL-6 (نزدیک سطح پایه‌ای IL-6 روز صفر) شد. هم‌چنین، درمان روزانه یا هفتگی گروه AA با آنتی‌بادی anti- IL-6 باعث کاهش معنی‌دار سطوح سرمی IL-6 در روزهای ١٤ و ۲۱ در مقایسه با گروه کنترل AA شد (P=۰/۰۰۱). تفاوت مشخصی بین گروه‌های تیمار شده به‌صورت هفتگی و روزانه وجود نداشت. در ضمن، گروه‌های تیمارشده با CFA و CFA+PBS تفاوت معنی‌داری را در سطوح IL-6 نشان ندادند (جدول شماره ۳).

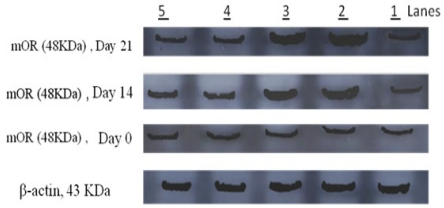
جدول شماره ۳- تغییرات سطوح سرمی IL-6 در طی مراحل مختلف AA در گروه‌های مورد مطالعه

		روزهای مطالعه		
		۰	١٤	۲۱
گروه‌های مطالعه	CFA	۰±۱۲	۵۸۷±۲۰ ***	۷٦۰±۲۵ ***
	CFA+PBS	۰±۱۱	۵۵۰±۱۷ ***	۷۳۰±۲۰ ***
	CFA+anti-IL-6(W):	۰±۱۳	۳۳±۱۹ ###	۳۵±۱۷ ###
	anti-IL-6(D):	۰±۱۱	۰±۱۲ ###	۰±۱۵ ###

سطوح سرمی IL-6 در طی مراحل مختلف AA افزایش یافت. درمان با آنتی بادی anti-Il-6 به‌صورت روزانه و هفتگی در طول AA باعث کاهش مشخص سطح سرمی IL-6 شد. داده‌ها به صورت میانگین±SEM ارایه شده است.
***P=۰/۰۰۱ افزایش سطوح سرمی IL-6 در طی مراحل مختلف AA در مقایسه با روز صفر. ### P=۰/۰۰۱ مقایسه بین سطوح سرمی IL-6 بین گروه‌های CFA و CFA+anti–IL-6.

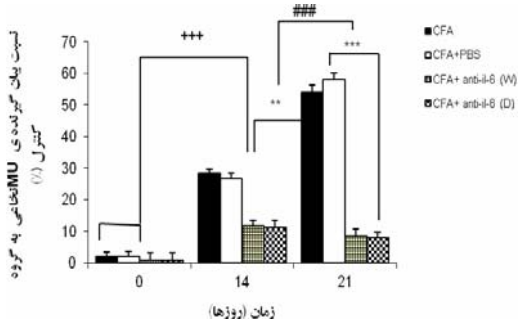
تغییرات بیان mOR نخاعی در طی مراحل مختلف AA:

وسترن بلات باندهای پروتئینی mOR با وزن مولکولی یکسان ٤٨ kDa در همه نمونه‌های به‌دست آمده از نخاع تمام گروه‌ها را نشان داد، که با گزارشات اولیه تطابق داشت. بعد از مشاهده‌ی باندهای mOR، کاغذها strip شده و دوباره با آنتی‌بادی β-actin به‌عنوان نمونه کنترل پوشانده شدند (43 kDa) (شکل شماره ۱). همه داده‌ها به‌صورت نسبت mOR به β-actin بیان شدند.



شکل شماره ۱- بیان پروتئین گیرنده mOR استخراج شده از نخاع در طی مراحل مختلف فاز مزمن AA (روزهای صفر، ١٤ و ۲۱). گروه‌ها عبارتند از: ۱- گروه کنترل، ۲- گروه AA، ۳- گروه AA+PBS، ٤- گروهی که به‌صورت روزانه با آنتی‌بادی anti-IL-6 درمان شده‌اند و ۵- گروهی که به‌صورت هفتگی با آنتی‌بادی anti-IL-6 درمان شده‌اند. β-actin به‌عنوان کنترل استفاده شده است.

آنالیزهای دانسیتومتری ثابت کرد که AA به‌صورت وابسته به زمان منجر به افزایش معنی‌دار بیان پروتئین mOR در روزهای ١٤ و۲۱ در مقایسه با گروه کنترل و روز صفر همان گروه گردیده است (P=۰/۰۰۱). بیان پروتئین mOR نخاعی در گروه AA در روز ۲۱ در مقایسه با روز ١٤ بعد از تزریق CFA به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (P=۰/۰۰۱) (شکل شماره ۲).



شکل شماره ۲- تزریق CFA باعث افزایش معنی‌دار بیان mOR نخاعی به‌صورت وابسته به زمان شد. مصرف آنتی‌بادی anti-IL-6 به‌صورت 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 ١٤ و ۲۱ در مقایسه با گروه کنترل AA کاهش یافت. داده‌ها به‌صورت میانگین±SEM بیان شده‌اند. P=۰/۰۰۱ +++مقایسه تراکم باندهای پروتئین mOR نخاعی بین روزهای مختلف فاز مزمن AA. ***P=۰/۰۰۱، **P=۰/۰۱. مقایسه تراکم باندهای پروتئینی mOR بین گروه‌های AA و AA+anti-IL-6 در روزهای متناسب. P=۰/۰۰۱ ###: مقایسه تفاوت تراکم باند پروئینی mOR در گروه AA و گروه تیمار شده با anti-IL-6 در روزهای ١٤ و ۲۱.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2022-06-25]

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 (٪ ۲/۱±۱۱/۹) و ۲۱ (٪ ۱/۸±۸/۵) در مقایسه با گروه کنترل AA شد (P=۰/۰۰۱، P=۰/۰۱)، ولی با این وجود بیان mOR در روزهای ۱۴ و ۲۱ به‌طور مشخصی بالاتر از روز صفر بود (P=۰/۰۱). 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 با anti-IL-6 در روز ۲۱ در مقایسه با گروه کنترل AA کاهش یافته و کمتر از روز ۱۴ است (P=۰/۰۰۱). مصرف PBS در موش صحرایی‌های 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 سایتوکاین‌هایIL-10 IL-6 ,IL-1 و TNFα اشاره کرد[۹]. مطالعات نشان داده‌اند که، سایتوکاین‌ها نقش مهمی را به‌وسیله‌ی 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 IL-6 طی التهاب ناشی از CFA افزایش یافته و تا روز ۲۱ بعد از AA در سطح بالایی باقی می‌ماند. بررسی‌ها حاکی از ارتباط نزدیک بین افزایش سطوح سرمی IL-6 و القاء بیماری‌های التهابی مانند آرتریت روماتویید و کرون می‌باشد [۹]. هم‌چنین، نشان داده شده است که ارتباط مشخصی بین سطوح IL-6 و سایر مارکرهای مختلف التهابی طی بیماری‌ها وجود دارد. با این وجود اثرات متغیر IL-6 طی شرایط مختلف بر فعالیت سیستم عصبی هنوز کاملا تعریف شده نمی‌باشد [۱۸]. مطالعه ما نشان داد که سطوح سرمی IL-6 به‌صورت وابسته به زمان در تغییرات هایپرآلژزی طی مراحل مختلف AA موثر می‌باشد. نتایج به‌دست آمده در این مطالعه نشان داد که تجویز آنتی‌بادی anti-IL-6 در موش صحرائی‌های گروه AA به‌طور معنی‌داری حجم پا را در همه روزهای بررسی کاهش داده است. این اثر ممکن است به‌دلیل نقش تحریکی IL-6 برروی سلول‌های اندوتلیال، دگرانوله شدن مونوسیت‌ها و آزادسازی پروتئین‌های مونوسیتی باشد؛ چراکه بیان این مولکول‌های بنیادی در ایجاد علائم التهابی نقش موثری دارد [۱۹] و می‌توان با بلوک کردن این مسیر به‌وسیله‌ی anti-IL-6 این علائم را درمان کرد. برخی بررسی‌ها نیز بیان‌گر کاهش پیشرفت آرتریت ایجاد شده به‌وسیله‌ی عامل التهابی کاراژینان در موش‌های درمان شده با آنتی‌بادی anti-IL-6 می‌باشد [۲۰]. با وجود اینکه که درمان با آنتی‌بادی anti-IL-6 طی این مطالعه باعث کاهش حجم پا در موش صحرایی‌های AA شد، ولی همان‌گونه که در نتایج اشاره گردید باعث حذف کامل ادم پا نگردید، به‌نحوی‌که پای مزبوردر 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 سایتوکاین‌هایی مانند، IL1,6 و TNF_{α} در جریان بروز ادم طی التهاب موثر هستند [۱۰]. بنابراین به‌نظر می‌رسد که مهار یکی از آنها به‌تنهایی باعث حذف کامل ادم پا نگردد. از دیگر نتایج این بود که بیان mOR در روزهای ۱۴ و ۲۱ بعد از ایجاد AA هم‌زمان با کاهش هایپرآلژزی، افزایش می‌یابد. این یافته‌ها در تائید مطالعات قبلی ما، که نالوکسان به‌عنوان آنتاگونیست mOR دارای اثرات هایپرآلژزیک در روز ۲۱ AA بود، نشان داد که mOR نخاعی در کاهش هایپرآلژزی در طی فاز مزمن (فاز آرتریتی) 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. IL-6 سایتوکاین مهمی در انتقال از مرحله حاد به مزمن التهاب است و در مراحل مختلف RA نقش بسیار مهمی دارد [٦]. بعضی مطالعات نشان داده‌اند که IL-6 اثرات التهابی، در التهاب مزمن ایجاد شده به‌وسیله‌ی کاراژینان داشته و باعث هایپرآلژزی 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 متعاقبا باعث افزایش هایپرآلژزی شد. البته این یافته‌های متفاوت در اثرات هایپرآلژزیک IL-6 در طی التهاب مزمن می‌تواند مربوط به زمان‌های مختلف مطالعه التهاب و روش‌های متفاوت سنجش سطوح IL-6 باشد. به‌علاوه نتایج ما و نتایج به‌دست آمده از مطالعات پیشین نشان

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2022-06-25]

داد که مصرف IL-6 در یک هفته بعد از تزریق CFA به کف پای موش‌های صحرایی به‌سرعت باعث ایجاد بی‌دردی می‌شود (٥ min) که به‌وسیله نالوکسان بلوک شده بود [٧]. آنالژزی در طی التهاب با آزادسازی اوپیوئیدهای درونی آزاد شده به‌وسیله‌ی 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 [٧]. هم-چنین، پیشنهاد می‌شود که IL-6 می‌تواند به‌عنوان تعدیل‌کننده دردهای التهابی و عضو کلیدی مسیر ارتباط سیستم ایمنی- اپیوئیدی در نظر گرفته شود [٤]. بنابراین انتظار می‌رود که حداقل قسمتی از اثرات آنتی‌هایپرآلژزیک IL-6 سرمی در طی فاز مزمن (آرتریتی) AA به‌وسیله‌ی افزایش بیان mOR نخاعی میانجی گری شود. نتایج ما هم‌چنین نشان داد که مصرف روزانه یا هفتگی دوز خنثی‌کننده آنتی‌بادی anti-IL-6 (٠/١ 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 به‌نظر می‌رسد که حداکثر آستانه فعالیت anti-IL-6 ممکن است نزدیک و یا حتی پایین‌تر از دوز ٠/١ μg/ml در هر هفته باشد، و مطالعه حاضر نمی‌تواند علی‌رغم مشاهده کاهش مشخص در پارامترهای بیماری، نتایج فارماکوکینتیک مرتبط با اثرات درمان با آنتی‌بادی anti-IL-6 را نشان دهد. این مطالعه اهمیت ارتباط وابسته به زمان بین سطوح سرمی IL-6 و التهاب ایجاد شده به‌وسیله‌ی CFA را نشان داد.

نتیجه‌گیری

در مجموع می‌توان گفت که افزایش سطح سرمی IL-6 در طی فاز مزمن (آرتریتی) بیماری، باعث کاهش هایپرآلژزی ناشی از التهاب می‌گردد، که ممکن است به‌وسیله‌ی افزایش بیان mOR میانجی‌گری شود. از طرف دیگر به‌دلیل نقش مرکزی IL-6 در بروز علائم بیماری‌های التهابی، مهار IL-6 ممکن است یک روش جدید برای کاهش علائم التهاب به‌ویژه هایپرآلژزی باشد. به‌نظر می‌رسد که برای نیل به اثرات درمانی ضد دردی مناسب طی تجویز داروی آنتی‌سایتوکاینی anti-IL-6، مرحله بیماری التهابی نظیر آرتریت روماتویید نیز باید درنظر گرفته شود. بررسی‌های بیشتر برای تعریف مناسب نحوه استفاده بالینی این آنتی‌سایتوکاین موثر در التهاب آرتریتی پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

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

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 arthiritis. ***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, Kishimot 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, Mirzaiee 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.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2022-06-25]

[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, Mihara 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.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2022-06-25]