

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.

تاثیر سطوح سرمی اینترلوکین-۶ بر روی هایپرالژزی و بیان گیرنده‌های اوبیوئیدی Mu نخاعی در طی التهاب مزمن ایجاد شده به وسیله‌ی ادجوانت کامل فروند

الهه تکیه^۱، جلال زرین قلم^{۱*}، هما مناہجی^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 هایپرالژزی، ادم و تغییرات بیان گیرنده‌های اوبیوئیدی 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 پای CFA در موش‌های صحرایی ایجاد شده و به ۴ گروه، و هر گروه به سه زیرگروه ۶ تایی، تقسیم شدند. آنتی IL-6 به‌دو صورت روزانه و هفتگی در طی ۲۱ روز مطالعه تزریق شد. میزان بیان گیرنده‌های اوبیوئیدی مو (mOR) نخاعی به‌وسیله‌ی تکنیک وسترن بلائینگ 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 ($P=0/001$)، درحالی‌که تزریق روزانه و هفتگی anti-IL-6 هایپرالژزی را در گروهی که با آنتی‌بادی تیمار شده بودند، در روزهای ۱۴ و ۲۱ به‌طور مشخصی افزایش داد (به ترتیب، $P=0/001$ ، $P=0/01$). آنتی‌بادی IL-6 به‌صورت وابسته به زمان باعث افزایش هایپرالژزی و کاهش مشخص بیان mOR (به ترتیب، $P=0/01$ ، $P=0/001$) در طی تیمار با آنتی IL-6 در روزهای ۱۴ و ۲۱ بعد از تزریق CFA شد. نتیجه‌گیری: این مطالعه اهمیت ارتباط وابسته به زمان بین سطوح سرمی IL-6 و هایپرالژزی 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 روماتوئید بسیار مهم است.

واژگان کلیدی: اینترلوکین-۶، هایپرالژزی، التهاب، ادجوانت کامل فروند

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

مقدمه

مطالعات بسیاری اهمیت سایتوکاین‌ها را در دردهای مزمن نشان داده‌اند [۵،۴]. 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 TNF α می‌شود [۳]. IL-6 سایتوکاینی با توانایی‌های مختلف است که در ابتدا به‌عنوان 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 میانچ‌های 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 اندوتلیال رگی این اعتقاد وجود دارد که IL-6 نقش پاتوژنیک مهمی را در پیشرفت التهاب که منجر به هایپرالژزی و ادم می‌شود، ایفا می‌کند [۷]. مطالعه قبلی ما نیز نشان داد که هایپرالژزی ایجاد شده به‌وسیله‌ی CFA تا روز ۷ بعد از تزریق ادامه پیدا می‌کند که با افزایش مدیاتورهای التهابی به‌ویژه IL-6 مرتبط است [۸]. میانچ‌گری 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-

تزریق کف پای 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 میانچ‌های التهابی شامل کمو-کاین‌ها و سایتوکاین‌هایی مانند اینترلوکین‌های ۱ و ۶ (& IL-1 IL-6) و فاکتور نکروز دهنده تومور α (TNF) است [۲،۳]. میانچ‌های 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 | دورنویس: ۰۲۱ ۲۲۴۳۹۹۷۱

پست الکترونیک: jzaringhalam@yahoo.com

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

استاندارد (22 ± 2) درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۶۰-۷۰ 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 ($100 \mu\text{l}$) 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 ($100 \mu\text{l}$) 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 پلتیسوموتر (model 7141; Ugo Basile; Comerio VA, Italy) انجام شد. به‌طور خلاصه، پای موش‌های صحرایی 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 هایپرآلرژی 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

کند؛ به‌طوری‌که مهار آن روشی جدید برای درمان التهاب‌های مزمن به‌شمار می‌رود [۹]. هم‌چنین مطالعات ثابت کرده‌اند بعضی از علائم 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 تقویت‌کننده التهاب و ضد التهابی IL-6 را نشان داده است که اهمیت ویژه‌ی درمان بیماری‌های التهابی با این سایتوکاین دارد. برخی مطالعات حاکی از این هست که IL-6 هم‌چنین از طریق فعال کردن سیستم اوبوئیدی 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 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 اپوئیدها در کاهش درد طی التهاب در شرایط مختلف بالینی و آزمایشگاهی، بررسی‌های بیشتر حاکی از افزایش بیان گیرنده‌های اپوئیدی موخاخ طی التهاب بود که می‌توانست توجیه مناسبی بر اثرات ضد درد اپوئیدهای 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 اپوئیدی 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 آرتریت مزمن ایجاد شده به‌وسیله CFA و بررسی اثرات درمان با آنتی IL-6 بر روی 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 ۴ گروه اصلی (۱: گروه CFA، ۲: گروه CFA+PBS، ۳: گروه Anti-IL-6 (تزریق روزانه)، ۴: گروه CFA+Anti-IL-6 (تزریق هفتگی))، تقسیم شدند. هر گروه به‌نوبه خود به ۳ زیر گروه (شامل روزهای ۰، ۱۴ و ۲۱) تقسیم شده و برای هر زیر گروه ۶ سر موش در نظر گرفته شد. حیوانات در قفس‌های پلی‌پروپیلن در شرایط

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 صحرایی با استفاده از ایزوفلوران بیهوش شده و نخاع آنها به سرعت 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 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1% NP40, 0.5 % sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 mM sodium orthovanadate, 2.5 µg/ml aprotinin, 2 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml pepstatin A) با دور ۲۰۰۰۰ برای مدت ۳۰ ثانیه هموژنیزه شدند (Brinkman Polytron Homogenizer). نمونه‌ها در سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰ در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. محلول رویی برای سنجش غلظت پروتئین جدا شد [۱۶]. مقدار مساوی از پروتئین‌ها (۶۰µg) 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 به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شده و به مقدار مساوی (۱۲ µl) در ژل پلی-اکریل آمید (Pager Gels 10 % Tris-Glycine, Bio-Rad) و به روش الکتروفورز برای ۶۰ دقیقه با ولتاژ ۱۲۰V از هم جدا شدند. پروتئین‌ها با استفاده از miniprotean II (Bio-Rad) در ولتاژ ۱۰۰ V به مدت ۸۵ دقیقه از روی ژل بر روی کاغذ PVDF (Millipore, Bedford, MA) منتقل شدند. سایت‌های غیر اختصاصی موجود بر کاغذ به وسیله ی 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; 0.05 % Tween-20 from ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA) به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۲۴ درجه پوشانده شده و سپس به مدت یک ساعت در دمای ۲۴ درجه با آنتی‌بادی اولیه محلول در بافر بلاکینگ (Rabbit polyclonal IgG 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 به مدت یک ساعت در دمای ۲۴ درجه انکوبه شدند. کاغذها ۳ بار با بافر بلاکینگ شسته شدند. فعالیت پروتئین‌ها با استفاده از سیستم ظهورگر کمی لومینسانس (ECL, Amersham) تشخیص داده شد. کاغذها با محلول stripping (2- mercaptoethanol, 2 % SDS, 62.5 mM Tris [pH 6.7]) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه و با آنتی‌بادی اولیه beta-actin (1:5000; Cell Signaling) به عنوان یک نمونه کنترل انکوبه شدند. تراکم باندها به وسیله نرم افزار سنجش تراکم NIH

در اتاقک‌های 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 تایمر دیجیتال که به یک منبع حراموش صحرایی 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. ۳ PWL 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 به دست آمده در صوموش صحرایی منفی بودن نشان‌دهنده هایپرالژزی در پای مورد نظر بود [۳].

سنجش سطوح IL-6 سرمی در نمونه‌های خونی:

نمونه خونی از عروق موش صحرایی و اوربیتال گوشه چشم حیوانات بیهوش شده با ایزوفلوران و به وسیله 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 ۱۵:۸ دقیقه صبح انجام شود). سطوح سرمی IL-6 به وسیله کیت ELISA استاندارد موش صحرایی (Bender Med System, UK) و بر اساس 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 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 [۱۴]. نظر به این مطالعات و طبق دستورعمل کارخانه تولیدکننده (catalogue number ab9770, دوز خنثی‌کننده ND₅₀) برای آنتی‌بادی anti-rat IL-6 توام با غلظت 0.1 ng/ml - 0.003 µg/ml در این مطالعه، در نظر گرفته شد. آنتی‌بادی 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.

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

طراحی مطالعه:

AA به وسیله 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 $\mu\text{g/ml}$) تهیه 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 آرتریتی)، ۳۰ دقیقه قبل از تزریق آنتی‌بادی انجام شد. میزان بیان گیرنده‌های مو نخاعی به وسیله وسترن بلائینگ در روزهای ۰، ۱۴ و ۲۱ در گروه‌های AA، AA همراه با anti-IL-6 (توزیع 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 به طور کامل خارج گردید و ابتدا در نیتروژن مایع سپس در دمای -80°C فریز شدند تا میزان بیان گیرنده‌های μ نخاعی به روش وسترن بلائینگ مورد سنجش قرار گیرد.

آنالیزهای آماری:

نتایج به صورت میانگین \pm انحراف از معیار استاندارد (SEM) گزارش شدند. آزمایشات وسترن بلائینگ در دو یا سه زمان مورد بررسی قرار گرفت و نتایج به وسیله آزمون unpaired t-test آنالیز شد. بررسی‌های درون‌گروهی هایپرالژزی 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 بین‌گروهی نیز برای دقت بیشتر از Unpaired t-test استفاده 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)

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 آنتی‌بادی 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 به دنبال تجویز آنتی‌بادی 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

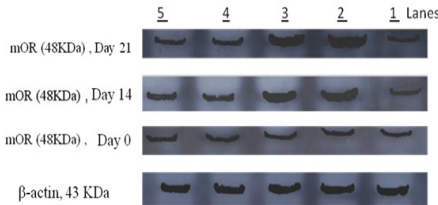
روزهای مطالعه		۰	۱۴	۲۱
گروه-های مطالعه	CFA	0 ± 1.2	74 ± 1.4 ***	87 ± 1.1 ***
	CFA+PBS	0 ± 1.1	75 ± 1.5 ***	89 ± 1 ***
	CFA+anti-IL-6(W):	0 ± 2	37 ± 2.6 ###	36.5 ± 2.1 ###
	anti-IL-6(D):	0 ± 2.1	35 ± 2.5 ###	34.1 ± 2.3 ###

تزریق CFA موجب ایجاد ادم در پای تزریق شده گردید که تا روز ۲۱ بعد از تزریق ادامه داشت و درمان با آنتی‌بادی 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 صحرایی‌های تیمار شده با CFA و گروه تیمار شده با CFA+anti-IL-6.

تغییرات هایپرالژزی حرارتی در طی مراحل مختلف AA:

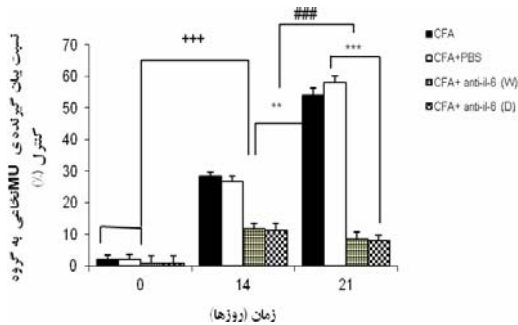
هایپرالژزی حرارتی ایجاد شده در پای چپ در طی مراحل مختلف AA متفاوت بود. سنجش PWL در گروه AA نشان داد که هایپرالژزی، بعد از تزریق CFA به طور معنی‌داری در روز ۱۴ و ۲۱ در مقایسه با روز صفر ($P=0.01$, $P=0.05$) و در روز ۲۱ نیز در مقایسه با روز ۱۴ کاهش داشته است ($P=0.001$). گروه‌های آزمایشی تیمار شده با آنتی‌بادی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

ها را نشان داد، که با گزارشات اولیه تطابق داشت. بعد از مشاهده باندهای mOR، کاغذها strip شده و دوباره با آنتی بادی β -actin به عنوان نمونه کنترل پوشانده شدند (43 kDa) (شکل شماره ۱). همه داده‌ها به صورت 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، ۱۴ و ۲۱). گروه‌ها عبارتند از: ۱- گروه کنترل، ۲- گروه AA، ۳- گروه AA+PBS، ۴- گروهی که به صورت روزانه با آنتی بادی anti-IL-6 درمان شده‌اند و ۵- گروهی که به صورت هفتگی با آنتی بادی anti-IL-6 درمان شده‌اند. β -actin به عنوان کنترل استفاده شده است.

آنالیزهای دانسیتومتری ثابت کرد که AA به صورت وابسته به زمان منجر به افزایش معنی دار 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 معنی داری افزایش یافت ($P=0/001$) (شکل شماره ۲).



شکل شماره ۲- تزریق CFA باعث افزایش معنی دار بیان mOR نخاعی به صورت 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. هم چنین، نسبت تراکم باندهای پروتئینی mOR نخاعی در گروه AA+anti-IL-6 در روزهای ۱۴ و ۲۱ در مقایسه با گروه کنترل AA کاهش یافت. داده‌ها به صورت میانگین \pm SEM بیان شده‌اند. $P=0/001$ +++مقایسه تراکم باندهای پروتئین mOR نخاعی بین روزهای مختلف فاز مزمن AA. $P=0/001$ ***، $P=0/01$ **مقایسه تراکم باندهای پروتئینی mOR بین گروه‌های AA و AA+anti-IL-6 در روزهای متناسب. $P=0/001$ ####مقایسه تفاوت تراکم باند پروتئینی mOR در گروه AA و گروه تیمار شده با anti-IL-6 در روزهای ۱۴ و ۲۱.

جدول شماره ۲- تغییرات هایپرآلزوی حرارتی در طی مراحل مختلف AA

در گروه‌های مورد مطالعه		روزهای مطالعه		
		۲۱	۱۴	۰
گروه‌های مطالعه	CFA	$-0/8 \pm 0/4$ *	$-2/4 \pm 0/3$ **	$0/7 \pm 0/1$
	CFA+PBS	$-0/9 \pm 0/3$ *	$-2/6 \pm 0/2$ **	$0/2 \pm 0/1$
	CFA+anti-IL-6(W):	+++ ###	++ ###	$1/1 \pm 0/1$
	anti-IL-6(D):	$-4/4 \pm 0/1$	$-3/6 \pm 0/4$	$0/4 \pm 0/2$

هایپرآلزوی در موش صحرایی‌های تیمار شده با CFA در روزهای ۱۴ و ۲۱ بعد از تزریق نسبت به روزهای نخست مطالعه کاهش نشان داد. داده‌ها به صورت میانگین \pm SEM نشان داده شده‌اند. $P=0/05$ *، $P=0/01$ **مقایسه تغییرات هایپرآلزوی بین روز صفر و روزهای دیگر مطالعه. $P=0/001$ +++ تفاوت بین هایپرآلزوی 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 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 سرمی IL-6 (نزدیک سطح پایه‌ای IL-6 روز صفر) شد. هم چنین، 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 ($P=0/001$). تفاوت مشخصی بین گروه‌های تیمار شده به صورت هفتگی و روزانه وجود نداشت. در ضمن، گروه‌های تیمار شده با CFA و CFA+PBS تفاوت معنی داری 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

در گروه‌های مورد مطالعه		روزهای مطالعه		
		۲۱	۱۴	۰
گروه‌های مطالعه	CFA	76 ± 25 ***	587 ± 20 ***	0 ± 12
	CFA+PBS	73 ± 20 ***	550 ± 17 ***	0 ± 11
	CFA+anti-IL-6(W):	35 ± 17 ###	33 ± 19 ###	0 ± 13
	anti-IL-6(D):	0 ± 15 ###	0 ± 12 ###	0 ± 11

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 ارائه شده است. $P=0/001$ *** افزایش سطوح 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 و CFA+anti-IL-6.

تغییرات بیان mOR نخاعی در طی مراحل مختلف AA:

استرن بلات باندهای پروتئینی mOR با وزن مولکولی یکسان ۴۸ kDa در همه نمونه‌های به دست آمده از نخاع تمام گروه-

اثرات درمان با آنتی‌بادی anti-IL-6 بر روی بیان mOR نخاعی در طی مراحل مختلف AA:

بیمار روزانه و یا هفتگی با anti-IL-6 باعث کاهش بیان پروتئین mOR نخاعی به صورت 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 ($P=0/001$, $P=0/01$). 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 با anti-IL-6 در روز ۲۱ در مقایسه با گروه کنترل AA کاهش یافته و کمتر از روز ۱۴ است ($P=0/001$). 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 سایتوکاین‌های IL-1, IL-6, IL-10 و TNF α 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 بیماری‌های 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 روماتوئید 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 کاملاً تعریف شده نمی‌باشد [۱۸]. مطالعه ما نشان داد که سطوح سرمی IL-6 به‌صورت وابسته به زمان در تغییرات هاپیرآلزوزی طی مراحل مختلف AA موثر می‌باشد. نتایج به‌دست آمده در این مطالعه نشان داد که تجویز آنتی‌بادی anti-IL-6

موش صحرایی‌های گروه AA به‌طور معنی‌داری حجم پا را در همه روزهای بررسی کاهش داده است. این اثر ممکن است به‌دلیل نقش تحریکی IL-6 بر روی سلول‌های اندوتلیال، دگراوله 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 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 سایتوکاین‌هایی مانند IL-6, 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 هاپیرآلزوزی، افزایش می‌یابد. این یافته‌ها در تایید مطالعات قبلی ما، که نالوکسان به‌عنوان آنتاگونیست mOR دارای اثرات هاپیرآلزوزیک در روز ۲۱ AA بود، نشان داد که mOR نخاعی در کاهش هاپیرآلزوزی 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 [۶]. بعضی مطالعات نشان داده‌اند که IL-6 اثرات التهابی، در التهاب مزمن ایجاد شده به‌وسیله‌ی کاراژینان داشته و باعث هاپیرآلزوزی 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 هاپیرآلزوزی شد. البته این یافته‌های متفاوت در اثرات هاپیرآلزوزیک 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

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

نتیجه گیری

در مجموع می توان گفت که افزایش سطح سرمی IL-6 در طی فاز مزمن (آرتریتی) بیماری، باعث کاهش هایپرآلژزی ناشی از التهاب می گردد، که ممکن است به وسیله افزایش بیان mOR میانجی گری شود. از طرف دیگر به دلیل نقش مرکزی IL-6 در بروز علائم بیماری های التهابی، مهار IL-6 ممکن است یک روش جدید برای کاهش علائم التهاب به ویژه هایپرآلژزی باشد. به نظر می رسد که برای نیل به اثرات درمانی ضد دردی مناسب طی تجویز داروی آنتی سائتوکاینی anti-IL-6، مرحله بیماری التهابی نظیر آرتریت روماتوئید نیز باید در نظر گرفته شود. بررسی های بیشتر برای تعریف مناسب نحوه استفاده بالینی این آنتی سائتوکاین موثر در التهاب آرتریتی پیشنهاد می شود.

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 موش های صحرایی به سرعت باعث ایجاد بی دردی می شود (5 min) که به وسیله نالوکسان بلوک شده بود [7]. آنالژزی در طی التهاب با آزادسازی اپیوئیدهای درونی آزاد شده به وسیله سلول های ایمنی بعد از تغییر در سطوح IL-6 مرتبط است. بعضی مطالعات نشان داده اند که IL-6 می تواند باعث افزایش بیان mOR, mRNA سلول های نوروبلاست انسانی (SH SY5Y cells) شود [7]. هم چنین، پیشنهاد می شود که IL-6 می تواند به عنوان تعدیل کننده دردهای التهابی و عضو کلیدی مسیر ارتباط سیستم ایمنی - اپیوئیدی در نظر گرفته شود [8]. بنابراین انتظار می رود که حداقل قسمتی از اثرات آنتی هایپرآلژزیک IL-6 سرمی در طی فاز مزمن (آرتریتی) AA به وسیله افزایش بیان mOR نخاعی میانجی گری شود. نتایج ما هم چنین نشان داد که مصرف روزانه یا هفتگی دوز خنثی کننده آنتی بادی 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 می تواند به نظر می رسد که حداکثر آستانه فعالیت anti-IL-6 ممکن است نزدیک و یا حتی پایین تر از دوز 0.1 µg/ml در هر هفته باشد، و مطالعه حاضر نمی تواند علی رغم مشاهده کاهش مشخص در پارامترهای بیماری، نتایج فارماکوکینتیک مرتبط با اثرات درمان با آنتی بادی

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 Freund's 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, 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 interleukin-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, 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.