بررسی نقش افزایش سطح سرمی فاکتور نکروز توموری آلفا بر تغییرات هایپرآلژزی و ادم طی مراحل مختلف التهاب ناشی از ادجوانت در موش‌های صحرایی نر

زینب اختری [١](M.Sc)، جلال زرین‌قلم [٢*](Ph.D)، اکرم عیدی [١](Ph.D)، سید علی حائری‌روحانی [٣](Ph.D)، الهه تکیه [٢](M.Sc)

١- *دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی*

٢- *دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، گروه فیزیولوژی*

٣- *دانشگاه تهران، گروه زیست‌شناسی*

چکیده

سابقه و هدف: فاکتور نکروزکننده توموری -آلفا (Tumor necrosis factor alpha,TNFα) یکی از سایتوکاین‌های مهمی است که عمل‌کردهای چندگانه و متفاوتی را طی التهاب از خود نشان می‌دهد. با توجه به نقش TNFα در القاء هایپرآلژزیا و ادم از طریق مسیرهای سیگنالیگ داخل سلولی هدف ما از این مطالعه بررسی نقش افزایش سطح سرمی فاکتور نکروز توموری آلفا بر روی تغییرات هایپرآلژزی و ادم و تغییرات بیان گیرنده‌های اوپیوئیدی مو طی مراحل مختلف التهاب ناشی از ادجوانت در موش‌های صحرایی نر بود.

مواد و روش‌ها: التهاب به وسیله تزریق CFA به کف پای حیوانات القا شده و علایم التهابی (هایپرآلژریا و ادم) در روزهای ٠، ٣، ٧، ١۴ و ٢١ ارزیابی شد. هم‌چنین آنتی‌بادی TNFα به صورت روزانه به مدت ٢١ روز به گروه‌های مختلف مورد مطالعه تزریق گردید. بیان mOR به وسیله تکنیک وسترن‌بلات شناسایی شد.

یافته‌ها: نتایج ما نشان داد که تزریق آنتی‌بادی TNFα به گروه آرتریتی شده موجب کاهش ادم و هایپرآلژریا تا روز ١۴ می‌شد در حالی که در روز ٢١ مطالعه علائم التهابی افزایش یافت. تزریق آنتی‌بادی TNFα موجب کاهش چشم‌گیری در بیان mOR نخاعی در روزهای ١۴ و ٢١ مطالعه در مقایسه با گروه‌های کنترل شد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که TNFα سرمی به صورت دو جانبه و وابسته به زمان بر روی ادم و هایپرآلژزیای القاء شده توسط CFA تاثیرگذار می‌باشد. هم‌چنین با توجه به نتایج به‌دست آمده طی این بررسی این امکان وجود دارد که بخشی از این تاثیرات خود را از طریق تغییر در بیان mOR نخاعی به انجام رساند.

واژه‌های کلیدی: افزایش غیر طبیعی حس درد، خیز، فاکتور نکروز توموری آلفا، گیرنده‌های اپیوییدی. مو

مقدمه

التهاب پاسخ موضعی، طی آسیب‌های بالقوه یا بالفعل بافتی است و به عنوان مکانیسم دفاعی فیزیولوژیک اولیه به بدن کمک می‌کند تا خود را علیه عفونت، سوختگی، مواد شیمیایی توکسیک، محرک‌های آلرژیک و دیگر محرک‌های آسیب‌رسان حفاظت کند [١]، که همراه با آزاد شدن مجموعه‌ای از مدیاتورهای مختلف مانند برادی کینین، هیستامین، سایتوکاین‌ها به‌ویژه IL-1، TNFα، IL-6 از سلول‌های خونی و بافت‌های آسیب‌دیده می‌باشد [٢]. سایتوکاین‌ها اثرات تحریکی و مهاری خود را روی سلول‌های ایمنی یا التهابی

* نویسنده مسئول، تلفن: ٠٢١-٢٢٤٣٩٩٧١ نمابر: ٠٢١ - ٢٢٤٣٩٩٧١ Email: jzaringhalam@yahoo.com

تاریخ دریافت: ١٣٩١/١/٢٧ تاریخ پذیرش: ١٣٩١/٨/٢١

www.SID.ir

اعمال می‌کنند که به‌طور قابل ملاحظه‌ای حساسیت نورون‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهند. سایتوکاین‌ها، همانند دیگر مدیاتورها ممکن است مستقیماً روی گیرنده‌های درد تاثیر گذارند [۳]. مطالعات اخیر نشان دادند که تولید سایتوکاین‌هایی مانند TNFα، IL-1، IL-6طی التهاب آرتریتی افزایش قابل ملاحظه‌ای می‌یابند. به نظر می‌رسد رهایش برخی سایتوکاین‌ها طی التهاب آرتریتی موجب تداوم بیماری و القاء علائم آن مانند هایپرآلژزیا و ادم می‌شود [۴].

آرتریت روماتوئید بیماری التهابی سیستمیک و مزمن با علت ناشناخته است. این بیماری مخرب التهابی با هیپرتروفی مایع سینوویال در غضروف و نفوذ سلول‌های التهابی همراه است [۵]. دردهای التهابی عمدتاً به‌دلیل آزاد شدن واسطه‌های التهابی مانند برادی کینین، هیستامین، پروستاگلاندین‌ها و عوامل ایمنی مانند سایتوکاین‌ها می‌باشند [۶].

القاء التهاب توسط تزریق کف پایی CFA (Complete Freund`s Adjuvant) یکی از روش‌های رایج جهت بررسی تغییرات سلولی، ملکولی و رفتاری طی بیماری‌های التهابی حاد و مزمن مانند آرتریت روماتویید در انسان می‌باشد. این مدل فازهای مختلف آرتریتی را در انسان نشان می‌دهد که در ارزیابی روش‌های درمانی مختلف نیز حائز اهمیت می‌باشد [۷]. التهاب محیطی ناشی از تزریق کف پایی CFA منجر به تغییراتی در سیستم عصبی مرکزی نیز می‌شود که به‌دنبال آن رفتارهایی مانند آلودینیای مکانیکی و هایپرآلژزیای حرارتی بروز می‌کند [۷]. هم‌چنین محققان نشان داده‌اند که تزریق کف پایی عوامل التهابی مانند CFA باعث کاهش آستانه تحریک آوران‌های محیطی در طناب نخاعی شده که نهایتاً منجر به هایپرآلژزیا و ادم شدید در طول اولین هفته بعد از مداخله می‌شود [۸]. تغییرات فیزیولوژیک و فارماکولوژیک ناشی از التهاب معمولاً یک ساعت بعد از تزریق CFA در پای تزریق شده، شروع گردیده و حداقل یک ماه ادامه دارد [۱۰،۹]. مطالعات نشان می‌دهد که مدل التهابی القا شده با CFA یک مدل دو فازی می‌باشد که در فاز اول با افزایش درد همراه است که به سبب حضور سایتوکین‌های التهابی نظیر IL-6, TNFα, IL-1 می‌باشد [۱۲،۱۱].

TNFα یکی از مهم‌ترین سایتوکاین‌های پیش‌التهابی است که می‌تواند التهاب میانجی شده با ایمنی را در سیستم عصبی مرکزی فعال نماید [۱۳] TNFα نقش کلیدی را در پاتوژنز بیماری آرتریت روماتوئید بازی می‌کند و استفاده از آنتاگونیست‌های این سایتوکاین‌ها نقش مهمی در کاهش علائم بیماری می‌تواند داشته باشد. اگرچه مکانیسم‌های مولکولی که به وسیله آن TNFα اثرات مخربش را در آرتریت روماتوئید نشان می‌دهد، دقیقاً تعریف نشده است ولی استفاده از آنتاگونیست‌های آن در حال حاضر یکی از روش‌های رایج درمان بالینی می‌باشد [۱۴].

همان‌طور که اشاره شد مدل التهابی القا شده با CFA یک مدل دو فازی می‌باشد که در فاز دوم، نشان داده شده که هایپرآلژزیا به طور چشم‌گیری در هفته سوم کاهش یافته است [۱۱]. شواهدی وجود دارد که پیش تیمار با آگونیست گیرنده اوپیوئیدی μ هایپرآلژزیای القا شده با آسیب حرارتی را طی فاز آرتریتی کاهش داده است. علاوه بر این محققان با کاربرد مطالعات سلولی- مولکولی تاثیرات متفاوتی از گیرنده‌های اوپیوئیدی نخاعی را در درد حاد و مزمن نشان داده‌اند [۱۵]. دانش‌مندان نشان داده‌اند که التهاب آرتریتی می‌تواند شماری از گیرنده‌های μ اوپیوئید را در هیپوتالاموس و در طناب نخاعی افزایش دهد [۱۶]. به نظر می‌رسد که گیرنده‌های اوپیوئیدی μ یکی از میانجی کننده‌های مهم اثرات آنالژزیک اوپیوئیدها باشند. علاوه بر این گیرنده‌های اوپیوئیدی μ در التهاب تنظیم افزایشی می‌شوند که ممکن است در بیان اثرات ضد دردی اوپیوئیدهای اندوژنز نقش داشته باشند [۱۷]. مطالعات نشان داده‌اند که سایتوکاین‌ها، پپتیدهای اوپیوئیدی را از سلول‌های ایمنی بافت ملتهب، آزاد می‌سازند که این موضوع سبب اثرات ضد دردی بر پایانه‌های عصبی حسی می‌شود [۱۸].

بنابراین با توجه به این‌که تاکنون اثرات کوتاه‌مدت استفاده از مهارکننده‌های TNFα مورد بررسی قرار گرفته است که صرفاً تاییدکننده نقش Pro-inflammatory این سایتوکاین

Archive of SID
www.SID.ir

بوده و هم‌چنین با توجه به این‌که نتایج مطالعات بالینی بیانگر عدم پاسخ‌دهی مناسب به استفاده از مهارکننده سایتوکاین TNFα در بهبود علایم آرتریت در فازهای مختلف به ویژه مزمن بود، بنابراین هدف از این مطالعه بررسی نقش افزایش سطح سرمی فاکتور نکروز توموری آلفا بر روی تغییرات هایپرآلژزی و ادم و تغییرات بیان گیرنده‌های اوپیوئیدی مو طی مراحل مختلف التهاب ناشی از ادجوانت در موش‌های صحرایی نر بود.

مواد و روش‌ها

حیوانات. این مطالعه به روش تجربی انجام شد و از موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (محدوده وزنی ۲۲۰-۱۸۰ گرم) استفاده گردید. حیوانات در قفس‌های پلی‌پروپیلن و در تمام مدت تحقیق در شرایط استاندارد (۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی، دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۵۵ درصد) نگه‌داری شدند و غیر از زمان آزمایش در تمامی اوقات به آب و غذا دسترسی کافی داشتند. هم‌چنین استفاده از حیواناتر در این پژوهش بر اساس قوانین رفتار با حیوانات آزمایشگاهی IASP و قوانین کمیته اتیک انجام شد [۱۹]. در تحقیق حاضر حیوانات شامل ۴ گروه اصلی (گروه کنترل CFA تنها روغن معدنی استریل را دریافت کردند و گروه CFA که تنها CFA را دریافت نمودند و گروه TNFαکه آنتی‌بادی TNFα را دریافت نمودند و گروه PBS که Vehicle آنتی‌بادی TNFα را دریافت کردند) بودند که هر گروه نیز دارای ۵ زیرگروه بود که برحسب زمان نمونه‌برداری به روزهای صفر، سه، هفت، چهارده و بیست و یک تقسیم شدند. در هر گروه تعداد ۶ سر موش صحرایی نژاد ویستار وجود داشت.

طراحی مطالعه. مطالعه طی یک دوره ۲۱ روزه انجام شد که اقدامات ما در طی این دوره برنامه‌ریزی گردید [۱۲]. ترتیب اقدامات به شرح زیر بود: قبل از انجام آزمایش ابتدا موش‌های صحرایی وزن شده، سپس به مدت نیم ساعت در محیط آزمایش‌گاه قرار گرفتند تا به محیط جدید عادت کردند. ابتدا تست‌های رفتاری در روز صفر انجام شد. سپس خون‌گیری از گوشه چشم جهت بررسی سطوح سرمی اولیه TNFαانجام گرفت. در ادامه تزریق CFA تحت شرایط بی‌هوشی سبک توسط ایزوفلوران (به خاطر روغنی بودن محلول) به مقدار ml ۰/۱ از CFA و ۰/۱ml آب مقطر دوبار تقطیر در کف پای راست حیوان صورت گرفت.

آنتی‌بادی TNFα از شرکت abcam با کد ab9755 تهیه و بر طبق پروتکل شرکت آماده و رقیق شد. با توجه به حداکثر مقدار این سیتوکاین در شرایط التهابی برای حداکثر فعالیت مهاری این آنتی‌بادی مقدار ۱۴۵ µ g/ml /۰-۰/۱۶۵ در حجم حداکثر ml ۱در هر روز از مطالعه به‌صورت تازه تهیه و به‌صورت روزانه و داخل صفاقی تجویز شد. لازم به ذکر است که حلال آنتی‌بادی PBS به عنوان vehicle در نظر گرفته شده و هر به مدت ۲۱ روز بین ساعت ۹- ۸ صبح به تزریق انجام شد. با توجه به زمان‌بندی التهاب ناشی از CFA و دو فازی بودن این نوع التهاب (فاز یک: هفته اول که فاز حاد و التهابی می‌باشد، فاز دوم: هفته دوم و سوم که فاز آرتریتی می‌باشد). در کل زمان‌های مطالعه برای بررسی تغییرات TNFα سرمی، هایپرآلژزیای حرارتی و ادم طی روزهای ۰ و ۳ و ۷ و ۱۴ و ۲۱ در نظر گرفته شد [۱۲،۱۱].

ایجاد التهاب ناشی از CFA . التهاب به وسیله‌ی تزریق زیر جلدی ۱۰۰ µl از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ضعیف شده و حل شده در روغن معدنی استریل (Sigma, St Louis, MO, USA 10 mg/ml)در کف پای راست حیوانات در روز صفر ایجاد شد [۲۰]. در رت‌های کنترل تنها روغن معدنی استریل (۱۰۰µl) تزریق شد. روز اول بعد از تزریق CFA به کف پا ادم غیر دو طرفه ایجاد گردیده و این شرایط طی هفته اول بعد از تزریق نیز ادامه پیدا کرد. تغییرات آن طی تجویز داخل صفاقی آنتی‌بادی TNFα در روزهای صفر، سه، هفت، چهارده و بیست و یک سنجیده شد.

تجویز آنتی‌بادی Anti-TNFα . برای سنجش نقش TNFαدر ایجاد علائم AA، رت‌ها با آنتی‌بادی anti- TNFα به منظور کاهش سطوح سرمی TNFα تیمار شدند. آنتی‌بادی

Archive of SID

www.SID.ir

TNFαتوسط سیستم‌هـای(Abcam/Uk) R&D (ab9755) تهیه شد.

طبق دسـتورالعمل کارخانـه تولیـدکننـده (Abcam)، دوز خنثی‌کننده (ND50) برای آنتی‌بادی anti-rat TNFα تـوام بـا غلظت ۲ ng/ml rat TNFα، ۰/۱۶۵ µg/ml–۰/۱۴۵ در این مطالعه، در نظر گرفته شد. آنتی‌بادی تخلیص شده‌ی TNFα در محلـول PBS (phosphate-buffered saline) بـرای تزریـق داخل صفاقی (i.p.) رقیق شد و گروه کنترل فقط PBS دریافت کردند. این محلول به صورت تازه و ۳۰ دقیقه قبـل از تزریـق تهیه گردید.

سنجش ادم پا با استفاده از دستگـاه پلتیسـمومتر. بـرای تایید سنجش تزریق صحیح CFA، حجم هر پا قبـل و بعـد از تزریق در طی زمان‌های متفاوت مورد سـنجش قـرار گرفـت. میـزان ادم یـا خیـز التهـابی توسـط دسـتگـاه پلتیسـمومتر اندازه‌گیری شد. بـه طـور خلاصـه، پـای رت‌هـا درون یـک محفظه‌ی شفاف حاوی محلول الکترولیتـی شـفاف فـرو بـرده خواهد شد و حجم مایع جابه جا شده که با حجم پا برابر است به وسیله‌ی یک نشانگر دیجیتال نمایش داده شد. اندازه‌گیـری حجم پا برای هر پا دو بار انجام و میانگین آن‌ها محاسبه شـد. مقدار ادم به وسیله سنجش تفاوت حجم پـا بـین روز صـفر و زمان‌های مختلف محاسبه شد [۲۱].

سنجش هایپرآلژزیـای حرارتـی. پـس کشـیدن پـا (Paw withdrawal latency, PWL) در اثـر حـرارت بـه کمـک دستگاه plantar test (Radiant heat) (ساخت شـرکت Ugo Basil، کشـور ایتالیـا) بـه وسـیله تسـت‌هـای کـف پـایی در گروه‌های کنترل و آزمایش انجام شد. رت‌هـا در اتاقـک‌هـای پلکسی‌گلاس به مدت ۱۰–۱۵ دقیقـه قبـل از آزمـایش قـرار گرفته تا به محیط آزمایش عادت کنند. این آزمایش با تاباندن اشعه مادون قرمز به طور نقطه‌ای از میان سطح پلاکسی‌گـلاس به کف پای سالم و آسیب‌دیـده حیـوان مـورد سـنجش قـرار گرفت. عقب کشیدن پا به طـور اتوماتیـک بـه وسـیله تـایمر دیجیتال که به یک منبع حرارتی متصل است ثبت شـد. PWL ۳ بار برای هر پا در فاصه زمانی ۵–۱۰ دقیقه سنجیده و مقدار میانگین محاسبه شد [۲۲]. مقدار محاسبه شده پای تزریق شده از مقدار محاسبه شده مربوط به پای دیگر کم شده و مقدار بـه دست آمده در صورت منفی بودن نشان‌دهنده هـایپرآلژزی در پای مورد نظر است.

سنجش سطوح TNFα سرمی در نمونه‌های خونی. نمونـه خونی از عروق رتروارویتال گوشـه چشـم رت‌هـایی کـه بـه وسیله ایزوفلوران بی‌هوش شده به وسیله‌ی لوله مویین هپارینه تهیه شد. هر بـار ۱/۵–۱ سـی‌سـی خـون جهـت تهیـه سـرم جمـع‌آوری مـی‌شـود. از هـر گـروه در روزهـای یـاد شـده خون‌گیری به عمل می‌آید. نمونه‌های خونی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجـه بـا دور ۱۳۰۰۰ سـانتریفیوژ شـده و سـرم حاصل در دمای ۷۰– درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. این کیت ساخت شرکتBender Med System کشور انگلـیس بـود. واکنش متقابل کیـت بـا TNFα سـرمی مـوش صـحرایی۱۰۰ درصد می‌باشد. واکنش متقابل کیت با TNFα سرم موش‌ها بر اساس دستورالعمل کیت سنجیده شد.

بررسی تغییرات بیان گیرنده‌های اوپیوئیدی مو نخاعی بـا روش وسترن‌بلات. پس از انجام تست‌های رفتـاری، از روش وسترن‌بلات به منظور بررسی میزان بیان گیرنده‌های اوپیوئیدی µدر طناب نخاعی بخش کمری استفاده شد [۲۳]. رت‌ها بـا ایزوفلـوران بـی‌هـوش شـده و سـرهای آن‌هـا جـدا شـدند. طناب‌های نخاعی هر کدام به سرعت روی یخ جدا شـده و در بافر لایزیز که حاوی مهارکننده‌های پروتئیناز است (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1mM ethylenediamineteraacetic 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) هموژنیزه شدند. سـپس بـه مـدت ۵ دقیقـه جوشـانده و بـرای ۱۰ دقیقـه سـانتریفیوژ در دور ۱۰۰۰۰ rpm در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد نمودیم. پروتئین استخراج شده برای آنالیز برداشت شده و غلظـت پـروتئین‌هـا شناسایی شدند. بعد از ۱۰ دقیقه جوشـاندن از نمونـه (۱۲µl) روی ژل پلـی‌اکریـل‌آمیـد لـود شـده و نمونـه‌هـا بـه وسـیله الکتروفورزیس جدا شدند (۱۲۰ ولـت بـه مـدت ۶۰ دقیقـه). نمونه‌های جدا شده از هر نخـاع روی هـر لایـن لـود شـده و

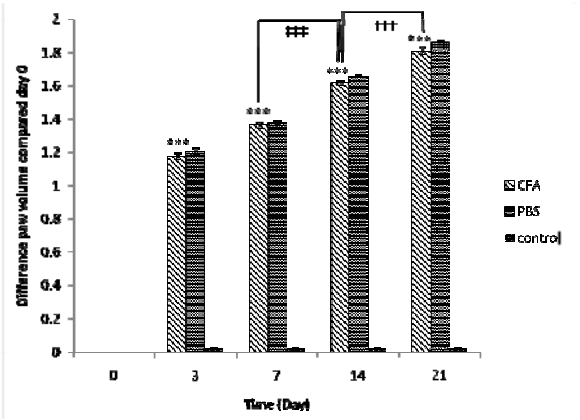
Archive of SID
www.SID.ir

سپس پروتئین‌ها به کاغذ PVDF با مینی‌پروتین II در ولتاژ ۱۰۰ برای ۸۵ دقیقه انتقال یافتند. جای‌گاه‌های باند غیراختصاصی روی کاغذ PVDF با انکوباسیون (۹۰ دقیقه در ۲۴ ساعت یا به صورت overnight در دمای ۴ درجه) در بافر بلاکینگ بلوکه شدند. سپس انکوباسیون با آنتی‌بادی اولیه در بافر بلاکینگ به مدت ۱ساعت در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد ادامه یافت. پس از آن غشاها با بافر بلاکینگ دو بار شسته شده و سپس با آنتی‌بادی ثانویه در بافر بلاکینگ به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. کاغذها سپس دو بار با تریس بافر بلاکینگ شسته شدند. واکنش ایمنی پروتین روی کاغذ با سیستم شناسایی chemoimmunoluminens مشاهده گردیدند. سپس در بافر striping در ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ دقیقه انکوبه شده تا برای استفاده دوباره برای آزمایش آنتی‌بادی‌های دیگر مورد استفاده قرار گیرند. غلظت باند از لحاظ دانسیتومتری با به کار بردن NIH Image اندازه‌گیری و گزارش گردید. هر آزمایش برای هر گروه ۳ بار تکرار شد.

آنالیز آماری. نتایج به‌صورت Mean±SEM ارائه شدند. مقایسه داخل گروهی ادم، هایپرآلژزیای حرارتی TNFα با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه One way ANOVA (Tukey's Post hoc) و Repeat measurement صورت پذیرفت. برای مقایسه دقیق‌تر تغییرات TNFα سرمی، هایپرآلژزیای حرارتی و ادم بین گروها از آزمون unpaired student t-test استفاده شد. نرم‌افزار مورد استفاده SPSS, version 19 بود، رسم نمودارها از طریق Excel انجام گردید. طی این مطالعه P <۰/۰۵ به‌صورت معنی‌دار تلقی شد.

نتایج

تغییرات حجم پنجه پا به دنبال تزریق CFA طی ۲۱ روز مطالعه. تزریق CFA در پنجه پای راست موش‌ها در روز صفر موجب القا التهاب و ادم در همان پنجه پا از روز اول پس از تزریق شد که این افزایش تا روز ۲۱ بعد از تزریق نیز ادامه داشت. حجم پنجه پا در روزهای ۳ و ۷، ۱۴ و۲۱ بعد از تزریق CFA در مقایسه با روز صفر افزایش مشخص و معنی‌داری را نشان داد (p<۰/۰۰۱). حجم پنجه پای تزریق شده در روز ۱۴ در مقایسه با روز ۷ افزایش معنی‌داری داشت (p<۰/۰۰۱) و این افزایش در روز ۲۱ نیز در مقایسه با روز ۱۴ معنی‌دار بود (p<۰/۰۰۱). اختلاف معنی‌داری از نظر ادم پا بین گروهی که تنها CFA دریافت کرده بودند و گروهی که CFA را به همراه PBS به عنوان Vehicle دریافت کرده بودند، در روزهای مختلف مطالعه طی ۲۱ روز دیده نشد (شکل ۱).



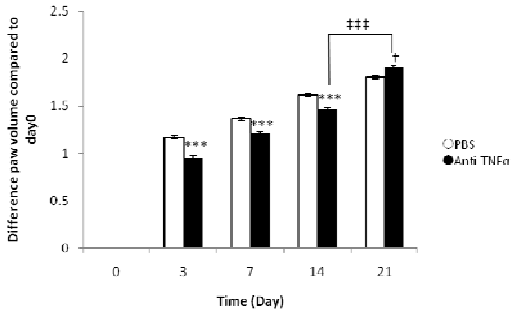
شکل۱. نمایش اثر CFA بر تغییرات حجم پنجه پا در روزهای مختلف بعد از تزریق CFA. نتایج به صورت mean ± SEM بیان شده و n=۶ است. P<۰/۰۰۱ *** : اختلاف معنی دار بین روزهای ۳ و ۷ و ۱۴ و ۲۱ نسبت به روز صفر. P<۰/۰۰۱ ††† : اختلاف معنی دار بین روزهای ۱۴ و ۲۱ بعد از تزریق CFA . P<۰/۰۰۱ ‡‡‡ : اختلاف معنی دار بین روزهای ۱۴ و ۷ بعد از تزریق CFA .

تغییرات حجم پنجه پا به‌دنبال تزریق روزانه آنتی‌بادی TNFα . تزریق صفاقی آنتی‌بادی TNFα به صورت روزانه باعث کاهش معنی‌دار ادم در روزهای ۳ و ۷ و ۱۴ در مقایسه با روزهای مشابه در گروه PBS شد p<۰/۰۰۱ برای همه گروه‌ها). در ادامه مطالعه، تداوم تزریق روزانه anti-TNFα باعث افزایش معنی‌دار ادم پنجه پا در روز ۲۱ در مقایسه با گروه PBS شد (p<۰/۰۵). هم‌چنین حجم پنجه پا در روز ۲۱ افزایش معنی‌داری را نسبت به روز ۱۴ در همین گروه نشان داد (p<۰/۰۰۱). (شکل ۲).

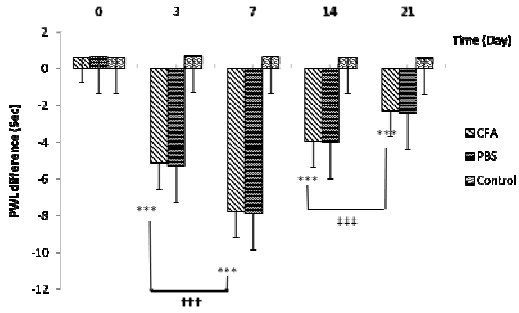
روند تغییرات هایپرآلژزیای حرارتی ناشی از تزریق CFA طی ۲۱ روز مطالعه. هایپرآلژزیا به طور معنی‌داری در روزهای ۳ و ۷ پس از تزریق CFA در مقایسه با روز صفر

Archive of SID
www.SID.ir

افزایش نشان داد (برای هر دو روز p<۰/۰۰۱). هم‌چنین نتایج نشان داد که التهاب مزمن موجب کاهش معنی‌دار هایپرآلژزیا در روزهای ۱۴ و ۲۱ مطالعه در مقایسه با روز صفر شد (p<۰/۰۰۱). علاوه بر این، هایپرآلژزیا در روز ۷ در مقایسه با روز ۳ به صورت معنی‌داری افزایش نشان داد (p<۰/۰۰۱) هایپرآلژزیا کاهش قابل معنی‌داری را در روز ۲۱ مطالعه در مقایسه با روز ۱۴ در گروه کنترل CFA نشان داد (p<۰/۰۰۱) (شکل ۳).

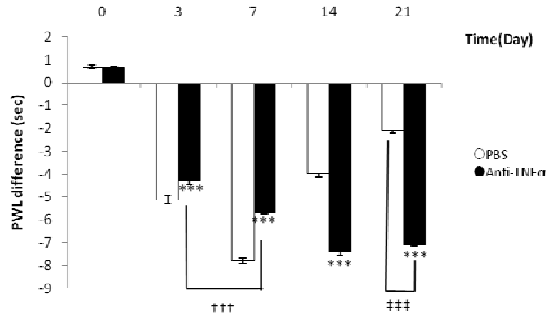


شکل۲.: نمایش اثر آنتی بادی TNFα بر تغییرات حجم پا در التهاب ۲۱ روزه ناشی از تزریق CFA. نتایج بصورت mean ± SEM بیان شده و n=۶ است. P<۰/۰۰۰۱ *** : اختلاف معنی دار روزهای ۳ ، ۷، ۱۴ نسبت به روز صفر. P<۰/۰۱ †: اختلاف معنی دار بین روز ۲۱ نسبت به روز صفر. P<۰/۰۰۰۱ ‡‡‡: اختلاف معنی دار بین روزهای ۱۴ و ۲۱.



شکل ۳. نمایش اثر CFA بر تغییرات هایپرآلژزیا در روزهای مختلف بعد از تزریق CFA. نتایج به صورت mean ± SEM بیان شده و n=۶ است. P<۰/۰۰۱ *** : اختلاف معنی دار بین روزهای ۳ و ۷ و ۱۴ و ۲۱ نسبت به روز صفر. P<۰/۰۰۱ †††: اختلاف معنی دار بین روزهای ۳ و ۷. P<۰/۰۰۱ ‡‡‡: اختلاف معنی دار بین روزهای ۱۴ و ۲۱.

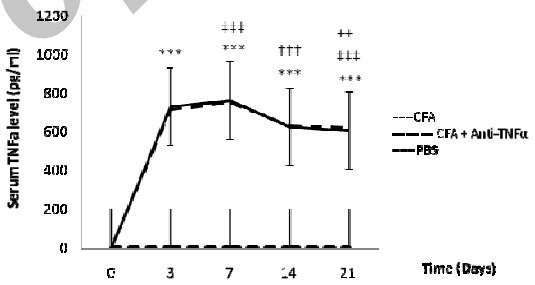
تغییرات هایپرآلژزیای حرارتی به دنبال تزریق آنتی‌بادی TNFα طی التهاب ناشی از CFA. تزریق آنتی‌بادی TNFα که به صورت روزانه تا ۲۱ روز ادامه یافت، موجب کاهش معنی‌دار هایپرآلژزیای حرارتی تا روز ۷ مطالعه گردید،ر اما این تاثیر در روزهای ۱۴ و ۲۱ پس از تزریق CFA تغییر کرده و هایپرآلژزیای حرارتی افزایش نشان داد. هایپرآلژزیای حرارتی به طور معنی‌داری در روزهای ۳ و ۷ پس از تزریق آنتی‌بادی TNFα در مقایسه با روزهای مشابه در گروه PBS کاهش یافت (p<۰/۰۰۱) برای هر دو روز). اما، با ادامه تزریق دوز خنثی‌کننده آنتی‌بادی TNFα افزایش معنی‌داری در هایپرآلژزیا در روزهای ۱۴ و ۲۱ مطالعه در گروه تیمارشده با آنتی‌بادی TNFα در مقایسه با روزهای مشابه در گروه PBS مشاهده شد (p<۰/۰۰۱ برای هر دو روز) (شکل ۴). هم‌چنین کاهش هایپرآلژزیا در روز ۲۱ در گروه تحت درمان با آنتی‌بادی TNFα در مقایسه با روز ۱۴ همان گروه نیز معنی‌دار بود (p<۰/۰۰۱). هایپرآلژزیا در روز ۷ در مقایسه با روز ۳ به طور معنی‌داری افزایش نشان داد (p<۰/۰۰۱). هم‌چنین اختلاف معنی‌داری از نظر هایپرآلژزیای حرارتی بین گروه کنترل و گروهی که PBS را به عنوان vehicle آنتی‌بادی دریافت کرده بودند، مشاهده نشد.



شکل ۴. نمایش اثر آنتی بادی TNFα بر تغییرات هایپرآلژزیا در ۲۱ روز. نتایج بصورت mean ± SEM بیان شده و n=۶ است. P<۰.۰۰۱*** اختلاف معنی دار بین روزهای ۳ ، ۷، ۱۴، ۲۱ نسبت به روز صفر. P< ۰/۰۰۱ †††: اختلاف معنی دار بین روزهای ۷ و ۳. P<۰/۰۰۱ ‡‡‡: اختلاف معنی دار بین روز ۲۱ در گروههای مختلف. اختلاف معنی داری بین گروههای دریافت کننده CFA و CFA + PBS مشاهده نگردید.

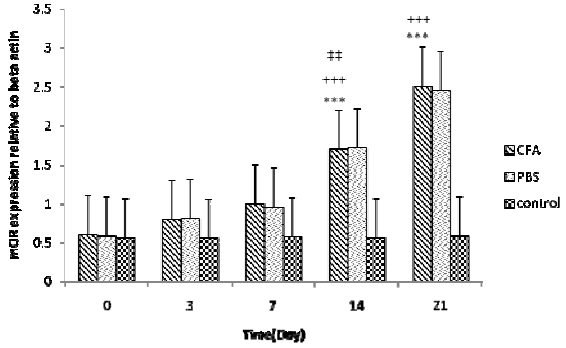
Archive of SID
www.SID.ir

بررسی مقادیر سرمی TNFα در مراحل مختلف مطالعه. تزریق CFA باعث القای افزایش معنی‌داری در سطوح سرمی TNFα گردید و این افزایش تا روز ۲۱ بعد از تزریق نیز ادامه یافت. تزریق کف پایی CFA باعث افزایش معنی‌دار سطح سرمی TNFα در روزهای ۳ و ۷ و ۱۴ و ۲۱ در مقایسه با روز صفر شد (p<۰/۰۰۱ برای همه روزها). مقادیر TNFα در روز ۲۱ مطالعه نسبت به روز ۷ کاهش معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۱). مقادیر سرمی TNFα در روزهای ۱۴و ۲۱ تفاوت معنی‌داری با هم‌دیگر نداشتند. تزریق مداوم دوز خنثی‌کننده آنتی‌بادی TNFα به صورت درون صفاقی باعث کاهش معنی‌دار سطوح سرمی TNFα در مقایسه با گروه PBS شد (p<۰/۰۰۱ برای همه روزها). تزریق PBS به‌عنوان حلال آنتی‌بادی تاثیر معنی‌دار در تغییرات مقادیر سرمی TNFα طی ۲۱ روز مطالعه نداشت (شکل ۵).



شکل۵. نمایش اثر آنتی بادی TNFα بر تغییرات مقادیر سرمی TNFα در ۲۱ روز. نتایج بصورت mean ± SEM بیان شده و n=۶ است. ++P<۰/۰۱: اختلاف معنی دار بین روزهای ۲۱ و ۷. *** P< ۰/۰۰۱: اختلاف معنی دار بین روزهای ۳ و ۷ و ۱۴ و ۲۱ نسبت به روز صفر. ‡‡‡ P<۰/۰۰۱: اختلاف معنی دار بین روزهای ۳ و ۷ و ۱۴ و ۲۱ با گروه PBS پس از تزریق آنتی بادی TNFα.

تغییرات بیان گیرنده‌های mu اوپیوئید نخاعی در طی مراحل مختلف مطالعه. آنالیزهای دانسیتومتری نشان داد که آرتریت القاء شده با CFA به صورت وابسته به زمان موجب افزایش معنی‌داری در بیان پروتئین mOR نخاعی شد اما این روند افزایشی از بعد از روز هفتم پس از تزریق CFA قابل مشاهده بود. نتایج ما نشان داد که بیان پروتئین mOR در رت‌های آرتریتی شده در روزهای ۱۴ و ۲۱ در مقایسه با روز صفر افزایش معنی‌داری داشت (p<۰/۰۰۱) و این افزایش در روز ۲۱ در مقایسه با روز ۱۴ چشم‌گیرتر بود (p<۰/۰۱). تزریق روزانه آنتی‌بادی TNFα در رت‌های آرتریتی شده، موجب کاهش قابل ملاحظه‌ای در بیان پروتئین mOR در روزهای ۱۴ و ۲۱ مطالعه در مقایسه با گروه PBS گردید (p<۰/۰۰۱) (شکل ۶).



شکل۶. نمایش اثر آنتی بادی TNFα بر تغییرات بیان mOR نخاعی طی التهاب ۲۱ روزه. نتایج بصورت mean ± SEM بیان شده و n=۶ است. *** P< ۰/۰۰۱: اختلاف معنی دار در روزهای ۱۴ و ۲۱ نسبت به روز صفردر گروه CFA. +++ P<۰/۰۰۱: اختلاف معنی دار بین روزهای ۱۴ و ۲۱ در گروههای مختلف. ## P<۰/۰۱: اختلاف معنی دار بین روزهای ۱۴ و ۲۱ در گروه CFA.

بحث و نتیجه‌گیری

هدف از این مطالعه بررسی روند تغییر هایپرآلژزیا و ادم طی التهاب ۲۱ روزه (طولانی‌مدت) ناشی از CFA و بررسی اثرات تزریق طولانی‌مدت آنتی‌بادی TNFα به صورت درون صفاقی بر روند علائم التهاب ایجاد شده توسط CFA و همچنین بررسی تغییرات بیان مو اوپیوئید رسپتورهای غشایی طی تیمار با آنتی‌بادی TNFα در طول التهاب القا شده با CFA بود.

تزریق CFA در کف پای راست رت‌ها در روز صفر موجب القا التهاب و ادم در همان پا می‌شود که این افزایش تا روز ۲۱ بعد از تزریق نیز ادامه خواهد یافت. مطابق با تحقیقات گذشته، این روند در رت‌های آرتریتی شده تا روز

Archive of SID

www.SID.ir

۲۱ ادامه داشت، اما نتایج ما نشان داد که تزریق آنتی‌بادی TNFα باعث کاهش معنی‌دار هایپرآلژزیا و ادم طی التهاب حاد (هفته اول) شد ولی تداوم تجویز آنتی‌بادی باعث افزایش هایپرآلژزیا و ادم طی التهاب مزمن ایجاد شده به‌وسیله CFA در مقایسه با گروه کنترل CFA گردید.

التهاب ایجاد شده به‌وسیله تزریق کف پایی CFA یکی از مدل‌های رایج حیوانی برای مطالعات مختلف دارویی و رفتاری طی بیماری‌های التهابی انسان است که شباهت زیادی به بیماری‌های التهابی انسان به‌ویژه آرتریت روماتوئید دارد [۲۴]. تزریق CFA به کف پای موش‌ها باعث ایجاد واکنش‌های التهابی می‌شود که برای بررسی فعالیت عناصر ضدالتهابی مناسب است.

در التهاب ایجاد شده به‌وسیله CFA دو فاز متفاوت وجود دارد که شامل: فاز ابتدایی (حاد: هفته اول) و فاز تاخیری (مزمن: هفته دوم به بعد) است [۷]. التهاب محیطی ناشی از تزریق کف پایی CFA منجر به تغییراتی در سیستم عصبی مرکزی نیز می‌شود که به‌دنبال آن رفتارهایی مانند آلودینیای مکانیکی بروز می‌کند [۸].

مطالعات نشان داده‌اند که به‌دنبال التهاب محیطی ناشی از القاء CFA، سلول‌های گلیال توسط سایتوکاین‌های پیش‌التهابی فعال می‌شود که فعالیت این سلول‌ها در بروز رفتارهای آلودینیای مکانیکی دخالت دارد [۵]. هم‌چنین محققان نشان داده‌اند که تزریق کف پایی عوامل التهابی مانند CFA باعث کاهش آستانه تحریک آوران‌های محیطی در طناب نخاعی شده که نهایتاً منجر به هایپرآلژزیا و ادم شدید در طول اولین هفته بعد از مداخله می‌شود [۹].

در فاز حاد التهاب ایجاد شده به‌وسیله CFA عمدتاً میانجی‌های متنوعی شامل هیستامین، سرتونین و کینین‌ها نقش دارند که از لکوسیت‌های مهاجرت کرده به بافت آسیب دیده آزاد می‌شوند [۲۵]. هم‌چنین مطالعات نشان می‌دهد که مدل التهابی القا شده با CFA یک مدل دو فازی می‌باشد که در فاز اول با افزایش درد همراه است که به سبب حضور سایتوکین‌های التهابی نظیر IL6, TNF-α, IL-1 می‌باشد که نقش مهمی در ایجاد علائم پاتولوژیک التهاب ایفا می‌کنند [۲۶]. یافته‌ها نقش مهمی را برای TNFα در القاء هایپرآلژزیای التهابی با عمل‌کرد مستقیم بر روی نورون‌ها تعریف می‌نمایند [۲۷]. هم‌چنین در بیماری آرتریت روماتویید نشان داده شده است که TNFα توسط ماکروفاژها در سینوویوم ملتهب آزاد شده و در این بیماران سطوح بالایی از TNFα به ثبت رسیده است [۲۸]. مطالعات نشان داده‌اند که سایتوکاین‌ها نقش مهمی را در آغاز آبشار الترهاب ایفا می‌نمایند. هم‌چنین آن‌ها قادرند تولید وترشح سایر مولکول‌های سیگنالی را که منجر به آزادسازی دیگر میانجی کننده‌های التهابی می‌شود، القا نمایند. سایتوکاین‌های پیش‌التهابی مانند TNFα, IL-1β, IL6 در آغاز و تشدید بسیاری از بیماری‌های التهابی دخیل هستند [۲۹]. در فاز حاد سایتوکاین TNFα نورون‌های دردی را به طور غیر مستقیم از طریق القا آبشار سایتوکاین‌های پیش‌التهابی شامل IL-1β, IL6, IL-8 حساس می‌سازد که منتج به آزادسازی پروستاگلاندین و دیگر میانجی‌کننده‌ها از سلول‌های ایمنی می‌شوند. هم‌چنین اعمال TNFα جریان کلسیمی را افزایش می‌دهد و حساسیت نورون‌ها به نوروتوکسین‌هایی نظیر کاپساسین را در محیط نورون‌های حسی افزایش می‌دهد [۲۷]. Ingelis و همکارانش نشان دادند که استفاده از آنتاگونیست TNFα در موش‌های آرتریتی شده با تزریق CFA موجب کاهش ادم و هایپرآلژزیا در سه روز نخست می‌شود [۲۷]. بنابراین با توجه به مطالعات قبلی و مکانیسم‌های دخیل در روند التهاب حاد ناشی از CFA، کاهش ادم و هایپرآلژزیا به‌دنبال تزریق آنتی‌بادی TNFα طی هفته اول این مطالعه قابل پیش‌بینی بود.

از سوی دیگر نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تداوم تجویز آنتی‌بادی TNFα موجب افزایش معنی‌دار ادم و هایپرآلژزیای حرارتی در مقایسه با گروه کنترل و یا نسبت به روزهای قبل می‌شود. همان‌طور که اشاره شد مدل التهابی القا شده با CFA یک مدل دو فازی می‌باشد که در فاز اول با افزایش درد همراه است که به سبب حضور سایتوکین‌های

Archive of SID
www.SID.ir

التهابی نظیر IL6, TNF-α, IL-1 می‌باشد. در حالی‌که در فاز دوم، نشان داده شده که هایپرآلژزیا به طور چشم‌گیری در هفته سوم کاهش یافته است [۱۲،۱۱]. برخی مطالعات بیانگر کاهش معنی‌دار هایپرآلژزیای حرارتی به‌دنبال تیمار با آگونیست گیرنده مو اوپیوئیدی طی فاز آرتریتی است. علاوه بر این محققان با کاربرد مطالعات سلولی- مولکولی بیان متفاوتی را از گیرنده‌های اوپیوئیدی نخاعی طی درد حاد و مزمن نشان داده‌اند [۱۵]. دانش‌مندان نشان داده‌اند که التهاب آرتریتی می‌تواند شماری از گیرنده مو اوپیوئیدی را در هیپوتالاموس و در طناب نخاعی افزایش دهد [۱۶]. گیرنده مو اوپیوئیدی یکی از میانجی‌کننده‌های مهم اثرات آنالژزیک اوپیوئیدها می‌باشند و با توجه به این‌که گیرنده مو اوپیوئیدی در التهاب دچار تنظیم افزایشی می‌شوند، به نظر می‌رسد که در تقویت اثرات ضد دردی اوپیوئیدهای اندوژنز نقش داشته باشند [۱۷]. برخی مطالعات نشان داده‌اند که سایتوکاین‌ها، پپتیدهای اوپیوئیدی را از سلول‌های ایمنی بافت ملتهب، آزاد می‌سازند که این موضوع سبب اثرات ضد دردی بر پایانه‌های عصبی حسی می‌شود [۱۸]. هم‌چنین برخی مطالعات حاکی از نقش سایتوکاین‌های پیش‌التهابی چون TNFα و IL-1 در القا سایتوکاین‌های ضد التهابی و فعال کردن مسیرهای تعدیل‌کننده درد و التهاب می‌باشند. بنابراین به نظر می‌رسد که تداوم استفاده از مهارکننده‌های این سایتوکاین‌های پیش‌التهابی با مهار و کاهش عوامل سایتوکاین‌های ضد التهابی باعث تشدید هایپرآلژزیا و التهاب خواهد شد و با مزمن شدن التهاب و تزریق آنتی‌بادی TNFα به صورت مزمن (۲۱ روزه) روند کاهشی به روند افزایشی در هایپرآلژزیا تبدیل می‌شود.

از سوی دیگر تزریق طولانی‌مدت دوزهای خنثی‌کننده آنتی‌بادی TNFα در این مطالعه هایپرآلژزیا را در رت‌های آرتریتی شده با CFA افزایش داد. مطالعات پیشین اثرات معنی‌دار تیمار با Etanercept (یک آنتی‌بادی TNFα) را بر روی علائم التهابی در دوره کوتاه‌مدت گزارش داده‌اند. هم‌چنین دانش‌مندان نشان داده‌اند که انتقال فاز حاد التهاب به فاز مزمن آن احتمالاً چندین سیستم را به طور هم‌زمان درگیر می‌نماید که یکی از آن‌ها شامل سیگنالینگ سایتوکاین‌ها به صورت مرکزی و محیطی می‌باشد. اگر چه مکانیسم‌های درگیر در این روند به خوبی شناسایی نشده‌اند، اما مطالعات اخیر نشان داد که التهاب مزمن با تغییرات فارماکولوژیکی و فیزیولوژیکی سیستم مهاری درد مرتبط است و اثرات آنالژزیکی اوپیوئیدهایی که به صورت محیطی در هنگام آسیب بافتی و التهاب اعمال شده بودند، مورد شناسایی قرار گرفته است. زرین‌قلم و هم‌کارانش نقش مهم افزایش بیان mOR نخاعی بر کاهش هایپرآلژزیاری فاز مزمن التهاب را گزارش داده‌اند. ارزیابی اثرات تزریق anti-TNFα به صورت طولانی‌مدت (۲۱روزه) بر بیان mOR نخاعی به وسیله روش وسترن‌بلات در این مطالعه کاهش معنی‌دار بیان این رسپتورهای اوپیوئیدی را در طول التهاب مزمن القاء شده با CFA نشان داد (روزهای ۱۴ و ۲۱). این مسئله پیشنهاد شده است که افزایش سطوح TNFα می‌تواند سنتز پپتیدهای سلولی را از مسیرهای مختلف به صورت مستقیم یا غیر مستقیم تغییر دهد. علاوه بر این، پاسخ‌های بیولوژیکی القاء شده توسط TNFα ممکن است موجب میانجی‌گری سایتوکاین‌های دیگری مانند IL6 و IL10 گردد. برخی از این سایتوکاین‌ها اثرات پیش‌التهابی و ضد التهابی را از خود نشان می‌دهند. Zollner و هم‌کارانش نشان دادند IL6، آنالژزیا را در یک مدل حیوانی التهاب با شرکت در فعال‌سازی سیستم اوپیوئید اندوژنز القاء می‌نماید. هم‌چنین زرین‌قلم و هم‌کارانش آشکار ساختند که تزریق آنتی‌بادی IL6 موجب هایپرآلژزیا به وسیله کاهش بیان mOR نخاعی در طول فاز مزمن التهاب القاء شده با CFA می‌شود. بنابراین می‌توان این احتمال را داد که تزریق آنتی‌بادی TNFα به صورت طولانی‌مدت نیز با کاهش ترشح و فعالیت سایتوکاین‌های پیش‌التهابی و ضد التهابی مثل IL6 ممکن است بیان mOR نخاعی را تغییر داده و به طور خلاصه می‌توان گفت که این مطالعه اثرات دوگانه و وابسته به زمان سطح TNFα سرمی را در هایپرآلژزیای القاء شده با CFA اثبات نمود و هم‌چنین این احتمال را می‌توان داد که حداقل

Archive of SID

www.SID.ir

بخشی از این اثرات را ممکن است از طریق تغییر در بیان mOR نخاعی به انجام برساند.

نتایج این مطالعه نشان داد که سایتوکاین TNFα دارای اثرات متفاوت و وابسته به زمان در روند القاء التهاب ناشی از CFA می‌باشد که ممکن است بخشی از این اثرات را از طریق تاثیر بر تغییرات بیان گیرنده‌های اوپیوئیدی مو اعمال نماید. بر اساس نتایج این مطالعه به نظر می‌رسد با تمرکز بیش‌تر بر شناسایی فاکتورهای آغازکننده آرتریت روماتوئید و تنظیم تعادل سایتوکاین‌ها طی این بیماری می‌توان ابزار موثری بر کنترل التهاب مزمن پیشنهاد نمود و این موضوع نیازمند بررسی‌های بیش‌تر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشکده پزشکی دانشگاه شهید بهشتی انجام شده است.

منابع

[1] Gilory DW. The endogenous control of acute inflammation – from onset to resolution. Drug Discov Today Ther strategics 2004; 1: 313-319.

[2] Rodriguez-Vita J, Lawrence T. The resolution of inflammation and cancer. Cytokine Growth Factor Rev 2010; 21: 61-65.

[3] Kress M. Nociceptor sensitization by proinflammatory cytokines and chemokines. Open Pain J 2010; 3: 97-107.

[4] Vallieres L, Rivest S. Interleukin-6 is a needed proinflammatory cytokine in the prolonged neural activity and transcriptional activation of corticotropin-releasing factor during endotoxemia. Endocrinology 1999; 140: 3890-3903.

[5] Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve—an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. Pharmacol Rev 2000; 52: 595-638.

[6] Feghali CA, Wright TM. Cytokines in acute and chronic inflammation. Front Biosci1997; 2: d12-26.

[7] Philippe L, Gegout-Pottie P, Guingamp C, Bordji K, Terlain B, Netter P, Gillet P. Relations between functional, inflammatory, and degenerative parameters during adjuvant arthritis in rats. Am J Physiol 1997; 273: 1550-1556.

[8] Gomez MA, Saenz MT, Garcia MD, Fernandez MA. Study of the topical anti-inflammatory activity of Achillea ageratum on chronic and acute inflammation models. Z Naturforsch C 1999; 54: 937-941.

[9] Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. Pain 1988; 32: 77-88.

[10] Chover-Gonzalez AJ, Harbuz MS, Tejedor-Real P, Gibert-Rahola J, Larsen PJ, Jessop DS. Effects of stress on susceptibility and severity of inflammation in adjuvant-induced arthritisa. Ann N Y Acad Sci 1999; 876: 276-286.

[11] Zaringhalam J, manaheji H, Maghsoodi N, Farokhi B, Mirzaiee V. Spinal mu-opioid receptor expression and hyperalgesia with dexamethasone in chronic adjuvant-induced arthritis in rats. Clin Exp Pharmacol Physiol 2008; 35: 1309-1315.

[12] Alani B, Maghsoudi N, Manaheji H, Tekieh E, Zardooz H, Zaringhalam J. Increased serum IL-6 level time-dependently regulated hyperalgesia and spinal mu opioid receptor expression during CFA-induced arthritis. Exp Clin Sci 2011; 10: 23-33.

[13] Bialecka M, Klodowska-Duda G, Kurzawaski M, Slawek J, Gorzkowska A, Opala G, et al. Interleukin-10 and tumor necrosis factorα genpolymorphisms in Parkinson's disease patients. Parkinsonism Relat Disord 2008; 14: 636-640.

[14] Garfield BE, Krahi T, Appel S, Cooper SM, Rincon M. Regulation of p38MAPK kinase in CD4 lymphcytes by infliximb therapy in patients with rheumatoid arthritis. Clin Immunol 2005; 116: 101-107.

[15] Maekawa K, Minami M, Masuda T, Satoh M. Expression of μ- and κ-, but not δ-, opioid receptor mRNAs is enhanced in the spinal dorsal horn of the arthritic rats. Pain1996; 64: 365-371.

[16] Mousa SA, Machelska H, Schafer M, Stein C. Immunohistochemical localization of endomorphin-1 and endomorphin-2 in immune cells and spinal cord in a model of inflammatory pain. J Neuroimmunol 2002; 126: 5-15.

[17] Schepers RJ, Mahoney JL, Shippenberg TS. Inflammation-induced changes in rostral ventromedial medulla mu and kappa opioid receptor mediated antinociception. Pain 2008; 136: 320-330.

[18] Czlonkowski A, Stein C, Herz A. Peripheral mechanisms of opioid antinociception in inflammation: involvement of cytokines. Eur J Pharmacol 1993; 242: 229-235.

[19] Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. Pain 1983; 16: 109-110.

[20] Cicala C, Ianaro A, Fiorucci S, Calignano A, Bucci M, Gerli R, et al. NO-naproxen modulates in inflammation, nociception and downregulates Tcell response in rat Freunds adjuvant arthiritis. Br J Pharmacol 2000; 130: 1399-1405.

[21] Ramakrishnan G, Joshua Allan J, Goudar K, Amit A. Comparative evaluation of anti-inflammatory activity of different extracts of boswellia serrata in wistar albino rats. Int J Pharm Tech Res 2011; 3: 261-267.

[22] Al-Hindawi MK, Al-Deen IH, Nabi MH, Ismail MA. Anti-inflammatory activity of some Iraqi plants using intact rats. J Ethnopharmacol 1989; 26:163-168.

[23] 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: 117-126.

[24] Woode E, Ainooson GK, Boakye-Gyasi E, Ansah C, Obiri DD, Koffour GA, et al. Anti-arthritic and antioxidant properties of the ethanolic stem bark extract of Newbouldia laevis (P. Beauv.) Seaman ex Bureau (Bignoniaceae). J Med Plants Res 2008; 2: 180-188.

[25] Maleki N, Garjani A, Nazemiyeh H, Nilfouroushan N, Eftekhar Sadat AT, Allameh Z, Hasannia N. Potent anti-inflammatory activities of hydroalcoholic extract from aerial parts of Stachys nflate on rats. J Ethnopharmacol 2001; 75: 213-218.

[26] James A. Rankin RN. Immunogenetics and rheumatoid arthritis: A review for orthopaedic nurses. J Orthopad Nurs 2005; 9: 64-76.

[27 Inglis JJ, Nissim A, Lees DM, Hunt SP, Chernajovsky Y, Kidd BL. The differential contribution of tumor necrosis factor to thermal and mechanical hyperalgesia during chronic inflammation. Arthritis Res Ther 2005; 7: 807- 816.

[28] Tristano AG. Tyrosine kinase as target in rheumatoid arthritis. Int Immunopharmacol 2009; 9: 1-9.

[29] Spears R, Oakes R, Bellinger LL, Hutchins B. Tumor necrosis factor-α and apoptosis in the rat temporomandibular joint. Arch oral Boil 2003; 48: 825-834.

Archive of SID

www.SID.ir

Role of increasing serum tumor necrosis factor on hyperalgesia and edema variation during different stages of adjuvant- induced arthritis in male rats

Zeinab Akhtari (M.Sc)[1], Jalal Zaringhalam (Ph.D)[*2] Akram Eidi (Ph.D)[1], Ali haeri Ruhani (Ph.D)[3], Elaheh Tekieh (M.Sc)[2]

1 – Dept. of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Physiology Dept. and Neuroscience Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Science, Tehran , Iran

3 - Dept. of Biology, Tehran University, Tehran, Iran

(Received: 15 Apr 2012 Accepted: 11 Nov 2012)

Introduction: Tumor necrosis factor α (TNF-α) is a potent cytokine that exerts pleiotropic functions in inflammatory symptoms. With regarding to the important role of TNFα in hyperalgesia and edema induction via intra-cellular signaling pathways, we aimed to investigate the role of increasing serum TNF-α on hyperalgesia and edema and spinal mu opioid receptor (mOR) expression variation during different stages of Complete Freound Adjuvant- induced arthritis in male rats.

Materials and Methods: Mono-arthritis was induced by CFA and then inflammatory symptoms (hyperalgesia and edema) were assessed on day 0, 3,7th, 14 and 21 following CFAinduction. In addition, anti-TNF-α was daily administered for 21 days for all different experimental groups. Spinal mOR expression were detected by western blotting.

Results: Our results showed that anti-TNFα administration in AA group resulted in decrease of paw volume and hyperalgesia until day 14, whereas, those symptoms were increased on day 21 following CFAinduction. Our study stated that anti- TNFα antibody administration causes a significant decreasing in spinal mOR protein expression on days 14 and 21 of the study.

Conclusion: This study confirmed the time-dependent and bi-directional effects of serum TNF-α levsel on CFA-induced hyperalgesia, which it can say, a portion of these effects might be mediated via spinal mOR expression variation.

Keywords: Hyperalgesia, Edema, Tumor necrosis factor-alpha, Receptors, Opioid, Mu

* Corresponding author: Fax: +98 21 22439971; Tel: +98 21 22439971

zaringhalam@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir