

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

زینب اخترى^۱ (M.Sc)، جلال زرین‌قلم^{۲*} (Ph.D)، اکرم عیدی^۱ (Ph.D)، سید علی حائری‌روحانی^۳ (Ph.D)، الهه تکیه^۲ (M.Sc)

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

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

۳- دانشگاه تهران، گروه زیست‌شناسی

چکیده

سابقه و هدف: فاکتور نکروز کننده توموری -آلفا (Tumor necrosis factor alpha, TNF α) یکی از سایتوکاین‌های مهمی است که عمل کردهای چندگانه و متفاوتی را طی التهاب از خود نشان می‌دهد. با توجه به نقش TNF α در القاء هایپرآلژزی و ادم از طریق مسیرهای سیگنالینگ 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 اوبیوئیدی مو طی مراحل مختلف التهاب ناشی از ادجوانت در موش‌های صحرائی نر بود. مواد و روش‌ها: التهاب به وسیله تزریق CFA به کف پای حیوانات القا شده و علائم التهابی (هایپرآلژزی و ادم) در روزهای ۰، ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ ارزیابی شد. هم‌چنین آنتی‌بادی TNF α به صورت روزانه به مدت ۲۱ روز به گروه‌های مختلف مورد مطالعه تزریق گردید. بیان mOR به وسیله تکنیک وسترن بلات شناسایی شد. یافته‌ها: نتایج ما نشان داد که تزریق آنتی‌بادی TNF α به گروه آرتیتری شده موجب کاهش ادم و هایپرآلژزی تا روز ۱۴ می‌شد در حالی که در روز ۲۱ مطالعه علائم التهابی افزایش یافت. تزریق آنتی‌بادی TNF α موجب کاهش چشم‌گیری در بیان mOR نخاعی در روزهای ۱۴ و ۲۱ مطالعه در مقایسه با گروه‌های کنترل شد. نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که TNF α سرمی به صورت دو جانبه و وابسته به زمان بر روی ادم و هایپرآلژزی القاء شده توسط CFA تاثیرگذار می‌باشد. هم‌چنین با توجه به نتایج به دست 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 اوبیوئیدی. 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 [۱]، که همراه با آزاد شدن مجموعه‌ای از مدیاتورهای مختلف مانند برادی‌کینین، هیستامین، سایتوکاین‌ها به‌ویژه IL-1، TNF α ، IL-6 از سلول‌های خونی و بافت‌های آسیب‌دیده می‌باشد [۲]. سایتوکاین‌ها اثرات تحریکی و مهاری خود را روی سلول‌های ایمنی یا التهابی

سایتوکین‌های التهابی نظیر IL-1, TNF α , IL-6 می‌باشد [۱۱، ۱۲].

TNF α یکی از مهم‌ترین سایتوکین‌های پیش‌التهابی است که می‌تواند التهاب میانجی شده با ایمنی را در سیستم عصبی مرکزی فعال نماید [۱۳]. TNF α نقش کلیدی را در پاتوژنز بیماری آرتریت روماتوئید بازی می‌کند و استفاده از آنتاگونیست‌های این سایتوکین‌ها نقش مهمی در کاهش علائم بیماری می‌تواند داشته باشد. اگرچه مکانیسم‌های مولکولی که به وسیله آن TNF α 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 هایپرآلژیا به طور چشم‌گیری در هفته سوم کاهش یافته است [۱۱]. شواهدی وجود دارد که پیش‌تیمار با آگونیست گیرنده اوبیوئیدی μ هایپرآلژیای القا شده با آسیب حرارتی را طی فاز آرتریتی کاهش داده است. علاوه بر این محققان با کاربرد مطالعات سلولی - مولکولی تأثیرات متفاوتی از گیرنده‌های اوبیوئیدی نخاعی را در درد حاد و مزمن نشان داده‌اند [۱۵]. دانش‌مندان نشان داده‌اند که التهاب آرتریتی می‌تواند شماری از گیرنده‌های μ اوبیوئید را در هیپوتالاموس و در طناب نخاعی افزایش دهد [۱۶]. به نظر می‌رسد که گیرنده‌های اوبیوئیدی μ یکی از میانجی‌کننده‌های مهم اثرات آنالژزیک اوبیوئیدها باشند. علاوه بر این گیرنده‌های اوبیوئیدی μ در التهاب تنظیم افزایشی می‌شوند که ممکن است در بیان اثرات ضد دردی اوبیوئیدهای اندوژن نقش داشته باشند [۱۷]. مطالعات نشان داده‌اند که سایتوکین‌ها، پپتیدهای اوبیوئیدی 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 TNF α مورد بررسی قرار گرفته است که صرفاً تأییدکننده نقش Pro-inflammatory این سایتوکین

اعمال می‌کنند که به‌طور قابل ملاحظه‌ای حساسیت نوروها را تحت تأثیر قرار می‌دهند. سایتوکین‌ها، همانند دیگر مدیاتورها ممکن است مستقیماً روی گیرنده‌های درد تأثیر گذارند [۳]. مطالعات اخیر نشان دادند که تولید سایتوکین‌هایی مانند TNF α , IL-1, IL-6 طی التهاب آرتریتی افزایش قابل ملاحظه‌ای می‌یابند. به نظر می‌رسد ره‌ایش برخی سایتوکین‌ها طی التهاب آرتریتی موجب تداوم بیماری و القاء علائم آن مانند هایپرآلژیا 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 به دلیل آزاد شدن واسطه‌های التهابی مانند برادی‌کینین، هیستامین، پروستاگلاندین‌ها و عوامل ایمنی مانند سایتوکین‌ها می‌باشند [۶].

القاء التهاب توسط تزریق کف پای CFA (Complete Freund's Adjuvant) یکی از روش‌های رایج جهت بررسی تغییرات سلولی، ملکولی و رفتاری طی بیماری‌های التهابی حاد و مزمن مانند آرتریت روماتوئید 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 پای CFA منجر به تغییراتی در سیستم عصبی مرکزی نیز می‌شود که به دنبال آن رفتارهایی مانند آلودینیای مکانیکی و هایپرآلژیای حرارتی بروز می‌کند [۷]. هم‌چنین محققان نشان داده‌اند که تزریق کف پای عوامل التهابی مانند CFA باعث کاهش آستانه تحریک آوران‌های محیطی در طناب نخاعی شده که نهایتاً منجر به هایپرآلژیا 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 [۹، ۱۰]. 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

ابتدا تست‌های رفتاری در روز صفر انجام شد. سپس خون‌گیری از گوشه چشم جهت بررسی سطوح سرمی اولیه TNF α انجام گرفت. در ادامه تزریق CFA تحت شرایط بی‌هوشی سبک توسط ایزوفلوران (به خاطر روغنی بودن محلول) به مقدار 0/1 ml از CFA و 0/1 ml آب مقطر دوبار تقطیر در کف پای راست حیوان صورت گرفت.

آنتی‌بادی TNF α 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 مهای این آنتی‌بادی مقدار 145 μ g/ml - 0/165 در حجم حداکثر 1 ml در هر روز از مطالعه به صورت تازه تهیه و به صورت 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 21 روز بین ساعت 8-9 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 آرتیتری می‌باشد). در کل زمان‌های مطالعه برای بررسی تغییرات TNF α سرمی، هایپرآلژزهای حرارتی و ادم طی روزهای 0، 3 و 7 و 14 و 21 در نظر گرفته شد [11، 12].

ایجاد التهاب ناشی از CFA. التهاب به وسیله‌ی تزریق زیر جلدی 100 μ l از مایکوباکتریوم تورکلوزیس 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 [20]. در رت‌های کنترل تنها روغن معدنی استریل (100 μ l) 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 TNF α در روزهای صفر، سه، هفت، چهارده و بیست و یک سنجیده شد.

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

بوده و همچنین با توجه به این‌که نتایج مطالعات بالینی بیانگر عدم پاسخ‌دهی مناسب به استفاده از مهارکننده سایتوکاین TNF α در بهبود علائم آرتیتری 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 اوبیوتیدی 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 220-180 گرم) استفاده گردید. حیوانات در قفس‌های پلی‌پروپیلن و در تمام مدت تحقیق در شرایط استاندارد (12 ساعت تاریکی و 12 ساعت روشنایی، دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد و رطوبت 55 درصد) نگهداری شدند و غیر از زمان آزمایش در تمامی اوقات به آب و غذا دست‌رسی کافی داشتند. همچنین استفاده از حیوانات نر در این پژوهش بر اساس قوانین رفتار با حیوانات آزمایشگاهی IASP و قوانین کمیته اتیک انجام شد [19]. در تحقیق حاضر حیوانات شامل 4 گروه اصلی (گروه کنترل CFA تنها روغن معدنی استریل را دریافت کردند و گروه CFA که تنها CFA را دریافت نمودند و گروه TNF α که آنتی‌بادی TNF α را دریافت نمودند و گروه PBS که Vehicle آنتی‌بادی TNF α را دریافت کردند) بودند که هر گروه نیز دارای 5 زیرگروه بود که برحسب زمان نمونه‌برداری به روزهای صفر، سه، هفت، چهارده و بیست و یک تقسیم شدند. در هر گروه تعداد 6 سر موش صحرایی نژاد ویستار وجود داشت.

طراحی مطالعه. مطالعه طی یک دوره 21 روزه انجام شد که اقدامات ما در طی این دوره برنامه‌ریزی گردید [12]. 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.

میانگین محاسبه شد [۲۲]. مقدار محاسبه شده پای تزریق شده از مقدار محاسبه شده مربوط به پای دیگر کم شده و مقدار به دست آمده در صورت منفی بودن نشان دهنده هایپرآلرژی در پای مورد نظر است.

سنجش سطوح TNF α سرمی در نمونه‌های خونی. نمونه خونی از عروق رتر و اوربیتال گوشه چشم رت‌هایی که به وسیله ایزوفلوران بی‌هوش شده به وسیله لوله موئین هیپارینه تهیه شد. هر بار ۱/۵-۱ سی‌سی خون جهت تهیه سرم جمع‌آوری می‌شود. از هر گروه در روزهای یاد شده خون‌گیری به عمل می‌آید. نمونه‌های خونی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شده و سرم حاصل در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. این کیت ساخت شرکت Bender Med System کشور انگلیس بود. واکنش متقابل کیت با TNF α سرمی موش صحرائی ۱۰۰ درصد می‌باشد. واکنش متقابل کیت با TNF α سرم موش‌ها بر اساس دستورالعمل کیت سنجیده شد.

بررسی تغییرات بیان گیرنده‌های اوبیوئیدی مو نخاعی با روش وسترن بلات. پس از انجام تست‌های رفتاری، از روش وسترن بلات به منظور بررسی میزان بیان گیرنده‌های اوبیوئیدی در طناب نخاعی بخش کمری استفاده شد [۲۳]. رت‌ها با ایزوفلوران بی‌هوش شده و سرهای آن‌ها جدا شدند. طناب‌های نخاعی هر کدام به سرعت روی یخ جدا شده و در بافر لایز 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 μ g/ml aprotinin, 2 μ g/ml leupeptin, 5 μ g/ml pepstatin A) هموژنیزه شدند. سپس به مدت ۵ دقیقه جوشانده و برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ در دور ۱۰۰۰۰ rpm در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد نمودیم. پروتئین استخراج شده برای آنالیز برداشت شده و غلظت پروتئین‌ها شناسایی شدند. بعد از ۱۰ دقیقه جوشاندن از نمونه (۱۲ μ l) روی ژل پلی‌اکریل‌آمید لود شده و نمونه‌ها به وسیله الکتروفورزیس جدا شدند (۱۲۰ ولت به مدت ۶۰ دقیقه). نمونه‌های جدا شده از هر نخاع روی هر لاین لود شده و

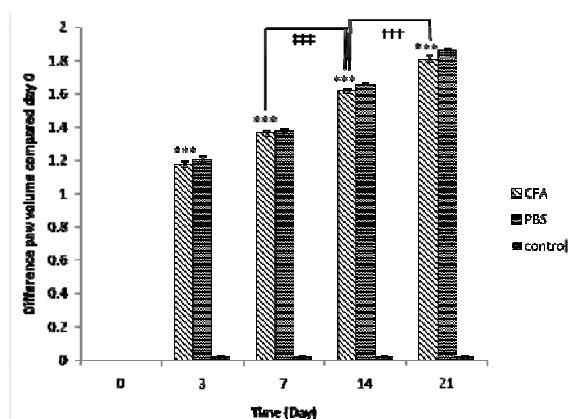
TNF α توسط سیستم‌های (Abcam/Uk) (ab9755) R&D تهیه شد.

طبق دستورالعمل کارخانه تولیدکننده (Abcam)، دوز خنثی‌کننده (ND50) برای آنتی‌بادی anti-rat TNF α توام با غلظت ۲ ng/ml rat TNF α ، ۰/۱۶۵-۰/۱۴۵ μ g/ml در این مطالعه، در نظر گرفته شد. آنتی‌بادی تخلیص شده‌ی TNF α در محلول PBS (phosphate-buffered saline) برای تزریق داخل صفاقی (i.p.) رقیق شد و گروه کنترل فقط PBS دریافت کردند. این محلول به صورت تازه و ۳۰ دقیقه قبل از تزریق تهیه گردید.

سنجش ادم پا با استفاده از دست‌گاه پلتیسومتر. برای تایید سنجش تزریق صحیح CFA، حجم هر پا قبل و بعد از تزریق در طی زمان‌های متفاوت مورد سنجش قرار گرفت. میزان ادم یا خیز التهابی توسط دست‌گاه پلتیسومتر اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه، پای رت‌ها درون یک محفظه‌ی شفاف حاوی محلول الکترولیتی شفاف فرو برده خواهد شد و حجم مایع جابه‌جا شده که با حجم پا برابر است به وسیله‌ی یک نشانگر دیجیتالی نمایش داده شد. اندازه‌گیری حجم پا برای هر پا دو بار انجام و میانگین آن‌ها محاسبه شد. مقدار ادم به وسیله سنجش تفاوت حجم پا بین روز صفر و زمان‌های مختلف محاسبه شد [۲۱].

سنجش هایپرآلژی‌ای حرارتی. پس کشیدن پا (Paw withdrawal latency, PWL) در اثر حرارت به کمک دستگاه (Radiant heat) plantar test (ساخت شرکت Ugo Basil، کشور ایتالیا) به وسیله تست‌های کف پای در گروه‌های کنترل و آزمایش انجام شد. رت‌ها در اتاقک‌های پلکسی‌گلاس به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه قبل از آزمایش قرار گرفته تا به محیط آزمایش عادت کنند. این آزمایش با تاباندن اشعه مادون قرمز به طور نقطه‌ای از میان سطح پلاکسی‌گلاس به کف پای سالم و آسیب‌دیده حیوان مورد سنجش قرار گرفت. عقب کشیدن پا به طور اتوماتیک به وسیله تایمر دیجیتالی که به یک منبع حرارتی متصل است ثبت شد. PWL ۳ بار برای هر پا در فاصله زمانی ۵-۱۰ دقیقه سنجیده و مقدار

تزریق CFA در مقایسه با روز صفر افزایش مشخص و معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.001$). حجم پنجه پای تزریق شده در روز ۱۴ در مقایسه با روز ۷ افزایش معنی‌داری داشت ($p < 0.001$) و این افزایش در روز ۲۱ نیز در مقایسه با روز ۱۴ معنی‌دار بود ($p < 0.001$). 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).



شکل ۱. نمایش اثر CFA بر تغییرات حجم پنجه پا در روزهای مختلف بعد از تزریق CFA. نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ بیان شده و $n=6$ است. $P < 0.001$: اختلاف معنی‌دار بین روزهای ۳ و ۷ و ۱۴ و ۲۱ نسبت به روز صفر. $P < 0.001$: اختلاف معنی‌دار بین روزهای ۱۴ و ۲۱ بعد از تزریق CFA. $P < 0.001$: اختلاف معنی‌دار بین روزهای ۱۴ و ۷ بعد از تزریق CFA.

تغییرات حجم پنجه پا به دنبال تزریق روزانه آنتی‌بادی $\text{TNF}\alpha$. تزریق صفاقی آنتی‌بادی $\text{TNF}\alpha$ به صورت روزانه باعث کاهش معنی‌دار ادم در روزهای ۳ و ۷ و ۱۴ در مقایسه با روزهای مشابه در گروه PBS شد $p < 0.001$ برای همه گروه‌ها). در ادامه مطالعه، تداوم تزریق روزانه $\text{anti-TNF}\alpha$ باعث افزایش معنی‌دار ادم پنجه پا در روز ۲۱ در مقایسه با گروه PBS شد ($p < 0.05$). هم‌چنین حجم پنجه پا در روز ۲۱ افزایش معنی‌داری را نسبت به روز ۱۴ در همین گروه نشان داد ($p < 0.001$). (شکل ۲).

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

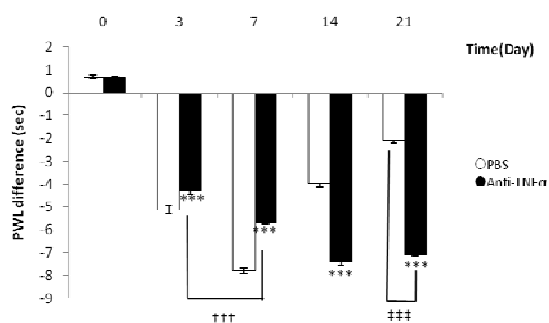
سپس پروتئین‌ها به کاغذ PVDF با مینی‌پروتین II در ولتاژ ۱۰۰ برای ۸۵ دقیقه انتقال یافتند. جای‌گاه‌های باند غیراختصاصی روی کاغذ PVDF با انکوباسیون (۹۰ دقیقه در ۲۴ ساعت یا به صورت overnight در دمای ۴ درجه) در بافر بلاکینگ بلوکه شدند. سپس انکوباسیون با آنتی‌بادی اولیه در بافر بلاکینگ به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد ادامه یافت. پس از آن غشاهای 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 پروتئین 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 دانسیتمتری با به کار بردن NIH Image اندازه‌گیری و گزارش گردید. هر آزمایش برای هر گروه ۳ بار تکرار شد.

آنالیز آماری. نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شدند. مقایسه داخل گروهی ادم، هایپراآلژزیای حرارتی $\text{TNF}\alpha$ با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One way ANOVA (Tukey's Post hoc) و Repeat measurement صورت پذیرفت. برای مقایسه دقیق‌تر تغییرات $\text{TNF}\alpha$ سرمی، هایپراآلژزیای حرارتی و ادم بین گروه‌ها 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 $P < 0.05$ به صورت معنی‌دار تلقی شد.

نتایج

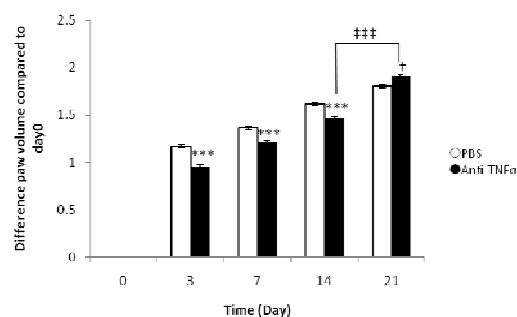
تغییرات حجم پنجه پا به دنبال تزریق CFA طی ۲۱ روز مطالعه. تزریق CFA در پنجه پای راست موش‌ها در روز صفر موجب القا التهاب و ادم در همان پنجه پا از روز اول پس از تزریق شد که این افزایش تا روز ۲۱ بعد از تزریق نیز ادامه داشت. حجم پنجه پا در روزهای ۳ و ۷، ۱۴ و ۲۱ بعد از

تغییرات هایپیرآلژزیای حرارتی به دنبال تزریق آنتی‌بادی $TNF\alpha$ طی التهاب ناشی از CFA. تزریق آنتی‌بادی $TNF\alpha$ که به صورت روزانه تا ۲۱ روز ادامه یافت، موجب کاهش معنی‌دار هایپیرآلژزیای حرارتی تا روز ۷ مطالعه گردید، اما این تاثیر در روزهای ۱۴ و ۲۱ پس از تزریق CFA تغییر کرده و هایپیرآلژزیای حرارتی افزایش نشان داد. هایپیرآلژزیای حرارتی به طور معنی‌داری در روزهای ۳ و ۷ پس از تزریق آنتی‌بادی $TNF\alpha$ در مقایسه با روزهای مشابه در گروه PBS کاهش یافت ($p < 0.001$) برای هر دو روز). اما، با ادامه تزریق دوز خنثی‌کننده آنتی‌بادی $TNF\alpha$ افزایش معنی‌داری در هایپیرآلژزیای در روزهای ۱۴ و ۲۱ مطالعه در گروه تیمار شده با آنتی‌بادی $TNF\alpha$ در مقایسه با روزهای مشابه در گروه PBS مشاهده شد ($p < 0.001$ برای هر دو روز) (شکل ۴). همچنین کاهش هایپیرآلژزیای در روز ۲۱ در گروه تحت درمان با آنتی‌بادی $TNF\alpha$ در مقایسه با روز ۱۴ همان گروه نیز معنی‌دار بود ($p < 0.001$). هایپیرآلژزیای در روز ۷ در مقایسه با روز ۳ به طور معنی‌داری افزایش نشان داد ($p < 0.001$). همچنین اختلاف معنی‌داری از نظر هایپیرآلژزیای حرارتی بین گروه کنترل و گروهی که PBS را به عنوان vehicle آنتی‌بادی دریافت کرده بودند، مشاهده نشد.

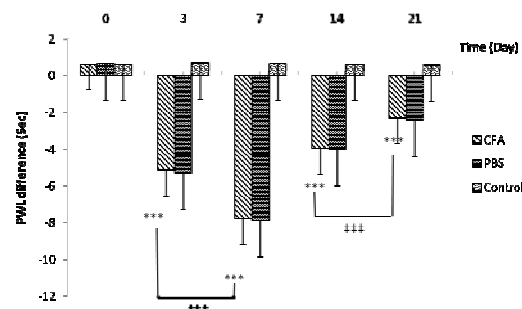


شکل ۴. نمایش اثر آنتی‌بادی $TNF\alpha$ بر تغییرات هایپیرآلژزیای در ۲۱ روز. نتایج بصورت $mean \pm SEM$ بیان شده و $n=6$ است. $P < 0.001$ اختلاف معنی‌دار بین روزهای ۳، ۷، ۱۴، ۲۱ نسبت به روز صفر. $P < 0.001$ اختلاف معنی‌دار بین روزهای ۳ و ۷. $P < 0.001$ اختلاف معنی‌دار بین روزهای ۲۱ در گروههای مختلف. $P < 0.001$ اختلاف معنی‌داری بین گروههای دریافت کننده CFA + و PBS مشاهده نگردد.

افزایش نشان داد (برای هر دو روز $p < 0.001$). همچنین نتایج نشان داد که التهاب مزمن موجب کاهش معنی‌دار هایپیرآلژزیای در روزهای ۱۴ و ۲۱ مطالعه در مقایسه با روز صفر شد ($p < 0.001$). علاوه بر این، هایپیرآلژزیای در روز ۷ در مقایسه با روز ۳ به صورت معنی‌داری افزایش نشان داد ($p < 0.001$). هایپیرآلژزیای کاهش قابل معنی‌داری را در روز ۲۱ مطالعه در مقایسه با روز ۱۴ در گروه کنترل CFA نشان داد ($p < 0.001$) (شکل ۳).

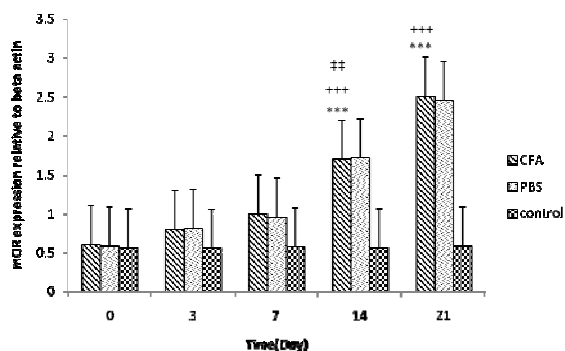


شکل ۲: نمایش اثر آنتی‌بادی $TNF\alpha$ بر تغییرات حجم پا در التهاب ۲۱ روزه ناشی از تزریق CFA. نتایج بصورت $mean \pm SEM$ بیان شده و $n=6$ است. $P < 0.001$ اختلاف معنی‌دار روزهای ۳، ۷، ۱۴ نسبت به روز صفر. $P < 0.001$ اختلاف معنی‌دار بین روز ۲۱ نسبت به روز صفر. $P < 0.001$ اختلاف معنی‌دار بین روزهای ۱۴ و ۲۱.



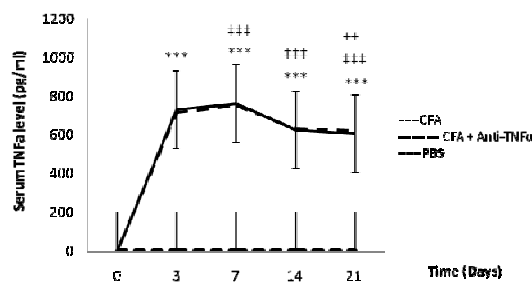
شکل ۳. نمایش اثر CFA بر تغییرات هایپیرآلژزیای در روزهای مختلف بعد از تزریق CFA. نتایج به صورت $mean \pm SEM$ بیان شده و $n=6$ است. $P < 0.001$ اختلاف معنی‌دار بین روزهای ۳ و ۷ و ۱۴ و ۲۱ نسبت به روز صفر. $P < 0.001$ اختلاف معنی‌دار بین روزهای ۳ و ۷. $P < 0.001$ اختلاف معنی‌دار بین روزهای ۱۴ و ۲۱.

رت‌های آرتریتی شده در روزهای ۱۴ و ۲۱ در مقایسه با روز صفر افزایش معنی‌داری داشت ($p < 0.001$) و این افزایش در روز ۲۱ در مقایسه با روز ۱۴ چشم‌گیرتر بود ($p < 0.01$). تزریق روزانه آنتی‌بادی TNF α در رت‌های آرتریتی شده، موجب کاهش قابل ملاحظه‌ای در بیان پروتئین mOR در روزهای ۱۴ و ۲۱ مطالعه در مقایسه با گروه PBS گردید ($p < 0.001$) (شکل ۶).



شکل ۶. نمایش اثر آنتی‌بادی TNF α بر تغییرات بیان mOR نخاعی طی التهاب ۲۱ روزه. نتایج بصورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ بیان شده و $n=6$ است. $P < 0.001$: اختلاف معنی‌دار در روزهای ۱۴ و ۲۱ نسبت به روز صفر در گروه CFA. $P < 0.001$: اختلاف معنی‌دار بین روزهای ۱۴ و ۲۱ در گروه‌های مختلف. $P < 0.01$: اختلاف معنی‌دار بین روزهای ۱۴ و ۲۱ در گروه CFA.

بررسی مقادیر سرمی TNF α در مراحل مختلف مطالعه. تزریق CFA باعث القای افزایش معنی‌داری در سطوح سرمی TNF α گردید و این افزایش تا روز ۲۱ بعد از تزریق نیز ادامه یافت. تزریق کف پای CFA باعث افزایش معنی‌دار سطح سرمی TNF α در روزهای ۳ و ۷ و ۱۴ و ۲۱ در مقایسه با روز صفر شد ($p < 0.001$ برای همه روزها). مقادیر TNF α در روز ۲۱ مطالعه نسبت به روز ۷ کاهش معنی‌داری نشان داد ($p < 0.01$). مقادیر سرمی TNF α در روزهای ۱۴ و ۲۱ تفاوت معنی‌داری با هم‌دیگر نداشتند. تزریق مداوم دوز خنثی‌کننده آنتی‌بادی TNF α به صورت درون صفاقی باعث کاهش معنی‌دار سطوح سرمی TNF α در مقایسه با گروه PBS شد ($p < 0.001$ برای همه روزها). تزریق PBS به‌عنوان حلال آنتی‌بادی تاثیر معنی‌دار در تغییرات مقادیر سرمی TNF α طی ۲۱ روز مطالعه نداشت (شکل ۵).



شکل ۵. نمایش اثر آنتی‌بادی TNF α بر تغییرات مقادیر سرمی TNF α در ۲۱ روز. نتایج بصورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ بیان شده و $n=6$ است. $P < 0.01$: اختلاف معنی‌دار بین روزهای ۲۱ و ۷. $P < 0.001$: اختلاف معنی‌دار بین روزهای ۳ و ۱۴ و ۲۱ نسبت به روز صفر. $P < 0.001$: اختلاف معنی‌دار بین روزهای ۳ و ۷ و ۱۴ و ۲۱ با گروه PBS پس از تزریق آنتی‌بادی TNF α .

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 TNF α به صورت درون صفاقی بر روند علائم التهاب ایجاد شده توسط CFA و همچنین بررسی تغییرات بیان مو اوپوئید رسپتورهای غشایی طی تیمار با آنتی‌بادی TNF α 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

تغییرات بیان گیرنده‌های mu اوپوئید 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

نقش مهمی در ایجاد علائم پاتولوژیک التهاب ایفا می‌کنند [۲۶]. یافته‌ها نقش مهمی را برای $TNF\alpha$ در القاء هایپرآلرژیای التهابی با عمل‌کرد مستقیم بر روی نورون‌ها تعریف می‌نمایند [۲۷]. هم‌چنین در بیماری آرتریت روماتوئید نشان داده شده است که $TNF\alpha$ توسط ماکروفاژها در سینوویوم ملتهب آزاد شده و در این بیماران سطوح بالایی از $TNF\alpha$ به ثبت رسیده است [۲۸]. مطالعات نشان داده‌اند که سایتوکاین‌ها نقش مهمی را در آغاز آبشار التهاب ایفا می‌نمایند. هم‌چنین آن‌ها قادرند تولید و ترشح سایر مولکول‌های سیگنالی را که منجر به آزادسازی دیگر میانجی‌کننده‌های التهابی می‌شود، القا نمایند. سایتوکاین‌های پیش‌التهابی مانند $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL6$ در آغاز و تشدید بسیاری از بیماری‌های التهابی دخیل هستند [۲۹]. در فاز حاد سایتوکاین $TNF\alpha$ نورون‌های دردی را به طور غیر مستقیم از طریق القا آبشار سایتوکاین‌های پیش‌التهابی شامل $IL-1\beta$, $IL-8$, $IL6$ حساس می‌سازد که منتج به آزادسازی پروستاگلاندین و دیگر میانجی‌کننده‌ها از سلول‌های ایمنی می‌شوند. هم‌چنین اعمال $TNF\alpha$ جریان کلسیمی را افزایش می‌دهد و حساسیت نورون‌ها به نوروتوکسین‌هایی نظیر کاپسازین را در محیط نورون‌های حسی افزایش می‌دهد [۲۷]. $Ingelis$ و هم‌کارانش نشان دادند که استفاده از آنتاگونیست $TNF\alpha$ در موش‌های آرتریتی شده با تزریق CFA موجب کاهش ادم و هایپرآلژیا 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 هایپرآلژیا به دنبال تزریق آنتی‌بادی $TNF\alpha$ طی هفته اول این مطالعه قابل پیش‌بینی بود.

از سوی دیگر نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تداوم تجویز آنتی‌بادی $TNF\alpha$ 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

۲۱ ادامه داشت، اما نتایج ما نشان داد که تزریق آنتی‌بادی $TNF\alpha$ باعث کاهش معنی‌دار هایپرآلژزیای ادم طی التهاب حاد (هفته اول) شد ولی تداوم تجویز آنتی‌بادی باعث افزایش هایپرآلژزیای ادم طی التهاب مزمن ایجاد شده به وسیله CFA در مقایسه با گروه کنترل CFA گردید.

التهاب ایجاد شده به وسیله تزریق کف پای CFA یکی از مدل‌های رایج حیوانی برای مطالعات مختلف دارویی و رفتاری طی بیماری‌های التهابی انسان است که شباهت زیادی به بیماری‌های التهابی انسان به ویژه 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 به وسیله 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 پای CFA منجر به تغییراتی در سیستم عصبی مرکزی نیز می‌شود که به دنبال آن رفتارهایی مانند آلودینیای مکانیکی بروز می‌کند [۸].

مطالعات نشان داده‌اند که به دنبال 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 پای عوامل التهابی مانند CFA باعث کاهش آستانه تحریک آوران‌های محیطی در طناب نخاعی شده که نهایتاً منجر به هایپرآلژزیای ادم شدید در طول اولین هفته بعد از مداخله می‌شود [۹].

در فاز حاد التهاب ایجاد شده به وسیله 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 $IL6$, $TNF-\alpha$, $IL-1$ می‌باشد که

التهابی نظیر IL-1, TNF- α , IL-6 می باشد. در حالی که در فاز دوم، نشان داده شده که هایپرالژزیا به طور چشم گیری در هفته سوم کاهش یافته است [۱۲،۱۱]. برخی مطالعات بیانگر کاهش معنی دار هایپرالژزیای حرارتی به دنبال تیمار با آگونیست گیرنده مو اوپیوئیدی طی فاز آرتریتی است. علاوه بر این محققان با کاربرد مطالعات سلولی - مولکولی بیان متفاوتی را از گیرنده های اوپیوئیدی نخاعی طی درد حاد و مزمن نشان داده اند [۱۵]. دانش مندان نشان داده اند که التهاب آرتریتی می تواند شماری از گیرنده مو اوپیوئیدی را در هیپوتالاموس و در طناب نخاعی افزایش دهد [۱۶]. گیرنده مو اوپیوئیدی یکی از میانجی کننده های مهم اثرات آنالژزیک اوپیوئیدها می باشند و با توجه به این که گیرنده مو اوپیوئیدی در التهاب دچار تنظیم افزایشی می شوند، به نظر می رسد که در تقویت اثرات ضد دردی اوپیوئیدهای اندوژن نقش داشته باشند [۱۷]. برخی مطالعات نشان داده اند که سایتوکاین ها، پپتیدهای اوپیوئیدی را از سلول های ایمنی بافت ملتهب، آزاد می سازند که این موضوع سبب اثرات ضد دردی بر پایانه های عصبی حسی می شود [۱۸]. هم چنین برخی مطالعات حاکی از نقش سایتوکاین های پیش التهابی چون TNF α و IL-1 در القا سایتوکاین های ضد التهابی و فعال کردن مسیرهای تعدیل کننده درد و التهاب می باشند. بنابراین به نظر می رسد که تداوم استفاده از مهارکننده های این سایتوکاین های پیش التهابی با مهار و کاهش عوامل سایتوکاین های ضد التهابی باعث تشدید هایپرالژزیا و التهاب خواهد شد و با مزمن شدن التهاب و تزریق آنتی بادی TNF α به صورت مزمن (۲۱ روزه) روند کاهشی به روند افزایشی در هایپرالژزیا تبدیل می شود.

از سوی دیگر تزریق طولانی مدت دوزهای خنثی کننده آنتی بادی TNF α در این مطالعه هایپرالژزیا را در رت های آرتریتی شده با CFA افزایش داد. مطالعات پیشین اثرات معنی دار تیمار با Etanercept (یک آنتی بادی TNF α) را بر روی علائم التهابی در دوره کوتاه مدت گزارش داده اند. هم چنین دانش مندان نشان داده اند که انتقال فاز حاد التهاب به فاز مزمن آن احتمالاً چندین سیستم را به طور هم زمان درگیر

می نماید که یکی از آن ها شامل سیگنالینگ سایتوکاین ها به صورت مرکزی و محیطی می باشد. اگر چه مکانیسم های درگیر در این روند به خوبی شناسایی نشده اند، اما مطالعات اخیر نشان داد که التهاب مزمن با تغییرات فارماکولوژیکی و فیزیولوژیکی سیستم مهاری درد مرتبط است و اثرات آنالژزیک اوپیوئیدهایی که به صورت محیطی در هنگام آسیب بافتی و التهاب اعمال شده بودند، مورد شناسایی قرار گرفته است. زرین قلم و همکارانش نقش مهم افزایش بیان mOR نخاعی بر کاهش هایپرالژزیای فاز مزمن التهاب را گزارش داده اند. ارزیابی اثرات تزریق anti-TNF α به صورت طولانی مدت (۲۱ روزه) بر بیان mOR نخاعی به وسیله روش وسترن بلات در این مطالعه کاهش معنی دار بیان این رسیپتورهای اوپیوئیدی را در طول التهاب مزمن القاء شده با CFA نشان داد (روزهای ۱۴ و ۲۱). این مسئله پیشنهاد شده است که افزایش سطوح TNF α می تواند سنتز پپتیدهای سلولی را از مسیرهای مختلف به صورت مستقیم یا غیر مستقیم تغییر دهد. علاوه بر این، پاسخ های بیولوژیکی القاء شده توسط TNF α ممکن است موجب میانجی گری سایتوکاین های دیگری مانند IL6 و IL10 گردد. برخی از این سایتوکاین ها اثرات پیش التهابی و ضد التهابی را از خود نشان می دهند. Zollner و همکارانش نشان دادند IL6، آنالژزیا را در یک مدل حیوانی التهاب با شرکت در فعال سازی سیستم اوپیوئید اندوژن القاء می نماید. هم چنین زرین قلم و همکارانش آشکار ساختند که تزریق آنتی بادی IL6 موجب هایپرالژزیا به وسیله کاهش بیان mOR نخاعی در طول فاز مزمن التهاب القاء شده با CFA می شود. بنابراین می توان این احتمال را داد که تزریق آنتی بادی TNF α به صورت طولانی مدت نیز با کاهش ترشح و فعالیت سایتوکاین های پیش التهابی و ضد التهابی مثل IL6 ممکن است بیان mOR نخاعی را تغییر داده و به طور خلاصه می توان گفت که این مطالعه اثرات دوگانه و وابسته به زمان سطح TNF α سرمی را در هایپرالژزیای القاء شده با CFA اثبات نمود و هم چنین این احتمال را می توان داد که حداقل

susceptibility and severity of inflammation in adjuvant-induced arthritis. *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] Alami B, Maghsoodi 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 factor α 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 lymphocytes by infliximab 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. *Pain* 1996; 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 Freund's adjuvant arthritis. *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, Eftekhari Sadat AT, Allameh Z, Hasannia N. Potent anti-inflammatory activities of hydroalcoholic extract from aerial parts of *Stachys nflata* 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.

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

نتایج این مطالعه نشان داد که سایتوکاین TNF α دارای

اثرات متفاوت و وابسته به زمان در روند القاء التهاب ناشی از

CFA می باشد که ممکن است بخشی از این اثرات را از طریق

تأثیر بر تغییرات بیان گیرنده های اویپوئیدی مو اعمال نماید. بر

اساس نتایج این مطالعه به نظر می رسد با تمرکز بیشتر تر بر

شناسایی فاکتورهای آغازکننده آرتريت روماتوئید و تنظیم

تعادل سایتوکاین ها طی این بیماری می توان ابزار موثری بر

کنترل التهاب مزمن پیشنهاد نمود و این موضوع نیازمند

بررسی های بیشتر تر می باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مرکز تحقیقات علوم اعصاب

دانشکده پزشکی دانشگاه شهید بهشتی انجام شده است.

منابع

[1] Gilroy 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 Biosci* 1997; 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

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 TNF α 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 Freund 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 CFA induction. 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-TNF α administration in AA group resulted in decrease of paw volume and hyperalgesia until day 14, whereas, those symptoms were increased on day 21 following CFA induction. Our study stated that anti- TNF α 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 level 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