

## بررسی اثر ضد التهابی مرفین در تجویز سیستمیک بر التهاب ناشی از تزریق کف پای کاراژینان در موش سوری نر

دکتر زهرا پورپاک \* PhD، دکتر محمود آل بویه \*\* PhD، دکتر ابوالحسن احمدیانی PhD،

\*گروه ایمونولوژی و آلرژی، مرکز طبی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تهران

\*\*گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

### چکیده

**مقدمه:** مصرف سیستمیک اپیوئیدها جهت تسکین درد از دیرباز شناخته شده ولی تجویز موضعی اپیوئیدها جهت تسکین درد جهت کاهش عوارض آن از یک دهه قبل آغاز گردیده است. مرفین علاوه بر اثرات ضد دردی برخی اثرات ضد التهابی را نیز از خود نشان داده ولی مکانیسم اثرات مرفین بر تنظیم سیستم ایمنی هنوز بطور کامل شناخته نشده است.

**مواد و روشها:** در مطالعه حاضر که در طی سال ۱۳۷۹ در گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه شهید بهشتی انجام گرفته، به بررسی اثر ضد التهابی مرفین در تجویز سیستمیک و اثر آن بر سطح سرمی اینترلوکین-۱ (IL-1) در مدل التهابی ناشی از تجویز کف پای کاراژینان پرداختیم.

**یافته ها:** تزریق کف پای کاراژینان (۰/۰۵ میلی لیتر از محلول ۳ درصد W/V) موجب ایجاد التهاب در پای تحت تزریق گردید. التهاب نیم ساعت پس از تزریق آغاز و در ساعت‌های سوم و چهارم به حداکثر خود رسید. پیش درمانی با مرفین در دوز ۱ mg/kg وزن بدن موجب افزایش التهاب ناشی از کاراژینان گردید ولی تجویز داخل صفاقی مرفین در دوز ۷ mg/kg وزن بدن موجب کاهش التهاب ناشی از کاراژینان از ساعت دوم تا ششم آزمایش شد. تجویز داخل صفاقی نالوکسان در دوزهای ۲ mg/kg و ۴۵ دقیقه قبل از تزریق کاراژینان و ۱۰ mg/kg در دقیقه ۱۶۵ پس از تجویز کاراژینان موجب مهار اثر ضد التهابی مرفین گردید. همچنین تزریق داخل صفاقی نالوکسان در دوز ۱۰ mg/kg و ۲۰ mg/kg موجب افزایش التهاب ناشی از کاراژینان در یکساعت ابتدای آزمایش گردید در حالی که تزریق کف پای نالوکسان در دوز ۲ mg/kg اثری بر التهاب ناشی از کاراژینان نداشت که این مسئله نشان دهنده اثر پپتیدهای درونزا Endogenous opioid peptid (EOP) در تنظیم التهاب ناشی از کاراژینان می باشد. اندازه گیری سطح سرمی IL-1 در گروه‌های مختلف نشانگر افزایش معنی دار IL-1 α در گروه تحت درمان با مرفین به همراه کاراژینان بود و پیش درمانی با نالوکسان در این گروه موجب کاهش سطح سرمی IL-1 گردید. همچنین تزریق داخل صفاقی آنتی IL-1 α در دوز ۷ μg/mice موجب افزایش التهاب ناشی از کاراژینان در گروه تحت درمان با مرفین در ۳ ساعت آخر آزمایش گردید در حالی که تجویز داخل صفاقی آنتی IL-1 α در دوزهای ۱۴ و ۲۸ μg/mice موجب خنثی شدن اثر ضد التهابی مرفین گردید.

**نتیجه گیری و توصیه ها:** نتایج این مطالعه نشان می دهد که IL-1 واسطه اثرات ضد التهابی مرفین بوده و نشان می دهد که افزایش IL-1 در کاهش التهاب نقش دارد.

## مقدمه

در اغلب گزارشات فوق به تداخل سایتوکین‌ها در پدیده التهاب اشاره می‌شود.

سایتوکین‌ها، واسطه‌های شیمیایی هستند که سبب افزایش (Up regulate) و کاهش (Down regulate) پاسخ‌های ایمنولوژیک و التهابی میزبان در برابر آسیب‌ها می‌گردند. سایتوکین‌هایی که توسط لنفوسیت‌ها ترشح می‌شوند لمفوکین و سایتوکین‌هایی که از مونوسیت‌ها یا فاگوسیت‌ها ترشح می‌شوند مونوکین نامیده می‌شوند. سایتوکین‌ها بصورت Paracrin و Autocrine عمل کرده و تنظیم کننده واکنش‌های میزبان در برابر آنتی‌ژن‌های خارجی یا مواد آسیب‌زا از طریق تنظیم در رشد، حرکت و تمایز لکوسیت‌ها و سایر سلول‌ها می‌باشند (۱۲). سایتوکین‌ها وظیفه هماهنگی (Orchestration) پاسخ‌های فیزیولوژیک و پاتولوژیک را بوسیله هماهنگی پاسخ‌های سلولی بعهده دارند (۱۳). سایتوکین‌ها از جنس پروتئین‌ها یا پپتیدها و برخی نیز بصورت گلیکوپروتئین هستند (۱۴). سایتوکین‌ها پروتئین‌های تنظیمی (regulatory) هستند که با حضور در تمامی نقاط بدن در تنظیم پاسخ‌های التهابی در تمام گونه‌های سلولی سیستم ایمنی دخالت دارند (۱۵) و تاکنون حدود ۱۰۰ نوع سایتوکین که در ۴ گروه طبقه‌بندی می‌شوند شناسایی شده و تعداد آنها رو به افزایش است (۱۶). اینترلوکین-۱ (IL-1) اولین سایتوکین شناخته شده در این میان بوده که به دو شکل IL-1 $\alpha$  و IL-1 $\beta$  وجود دارد و نقش مهمی را در شروع و تداوم التهاب (۱۷) و نیز برخی بیماری‌های التهابی عفونی و غیر عفونی (۱۸) بعهده دارد.

همچنین نقش‌های متفاوتی برای IL-1 گزارش شده است. برای مثال IL-1 واسطه مهمی در سیستم نروایمونو-اندوکرین می‌باشد (۱۹). نقش محافظتی IL-1 در عفونت‌های مایکوباکتریال در موش‌های فاقد ژن IL-1 نشان داده شده است (۲۰). Tani ishi و همکارانش نشان دادند که تولید موضعی IL-1 $\alpha$  و فاکتور نکروز کننده تومور آلفا (TNF- $\alpha$ ) توسط اوستئوکلاست‌ها مکانیسم مهمی در تنظیم تمایز و برداشت استخوان توسط استئوکلاست‌ها می‌باشد (۲۱).

همچنین نقش اینترلوکین-۱ در تنظیم اسپرماتوزون (۲۲) و همچنین اثرات آن در ایجاد درد و بی‌دردی در تجویز در مناطق مختلف مغزی (۲۳) و نیز فعالیت ضد توموری IL-1 (۲۴) نشانگر نقش فراگیر این سایتوکین در بدن می‌باشد.

مصرف سیستمیک اوپیوئیدها جهت تسکین دردهای شدید از بیش از ۲۰۰۰ سال قبل از میلاد مسیح بکار می‌رفته (۱) ولی مصرف موضعی اوپیوئیدها جهت تسکین دردهای موضعی در دهه اخیر شناخته شده است. مصرف موضعی اوپیوئیدها جهت تسکین دردها موضعی بویژه در حالت‌های التهابی دردناک نظیر تجویز موضعی آگونیست‌های کاپا در ارتروز (۱،۲) و یا استفاده از مرفین به همراه بی‌حس‌کننده‌های موضعی برای درمان صدمات و التهابات در جراحی‌های دندانپزشکی (۳) و کاهش دردهای پس از جراحی زانو با تجویز موضعی مرفین (۴) نشان می‌دهد که اوپیوئیدهای آگوزون توانایی بروز اثرات ضد دردی از طریق رسپتورهای موضعی اوپیوئیدی موجود بر روی بافت‌های ملتهب محیطی را دارند (۵).

شواهد زیادی وجود دارد که نشان‌دهنده تداخل اوپیوئیدها با سیستم ایمنی می‌باشد. اوپیوئیدهای اندوزن و آگوزن از طرق پیچیده‌ای با سیستم ایمنی تداخل دارند که برخی از اجزای دخیل در پاسخ ایمنی مثل گرانولوسیت-ماکروفاژ در آن دخیل هستند (۶) و منبع قابل تصور برای اوپیوئیدهای اندوزن در بافت‌های التهابی، سلول‌های ایمنی می‌باشد. نشان داده شده است که سلول‌های ایمنی حاوی و آزاد کننده پپتیدهای اوپیوئیدی در برون تن (in vitro) بوده و عوامل سرکوبگر ایمنی می‌توانند این اثرات را مهار کنند (۵) و همین اوپیوئیدهای آزاد شده از سلول‌های ایمنی در بافت ملتهب موجب تسکین درد می‌شوند (۷) همچنین افزایش رسپتورهای اوپیوئیدی در التهاب بافت‌های محیطی نشان داده شده است (۱).

مرفین علاوه بر اثرات ضد دردی برخی اثرات ضد التهابی را نیز از خود نشان داده است. شواهدی مثل کاهش هیپرترمی و نشت مایعات عروقی ناشی از کارائینان، توسط مرفین (۸) و نیز تمایل اوپیوئیدها به سرکوب سیستم ایمنی (۹) و سرکوب ادم و هیپرترمی ناشی از کارائینان توسط اوپیوئیدها (۸) و تغییر در شیمیوناکسی لکوسیت‌ها و سرکوب صدمات اندوتلیوم ناشی از گرانولوسیت‌ها در یک مکانیسم قابل بازگشت توسط نالوکسان (۱۰) نشانگر اثرات ضد التهابی مرفین می‌باشد ولی مکانیسم اثرات مرفین بر تنظیم سیستم ایمنی هنوز بطور کامل شناخته نشده است (۱۱) با این همه

شد و برای مقایسه به میزان برابر از سالیین نرمال به کف پای مقابل تزریق شد. التهاب ایجاد شده محدود به پای تحت تزریق کاراژینان مشاهده شد.

برای اندازه‌گیری حجم ناشی از التهاب از پلنسیوموتر جیوه‌ای (۳۱) استفاده شد و وزن پای تحت تزریق قبل و در ساعات ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ بعد از تزریق اندازه‌گیری و سپس با استفاده از جرم حجمی جیوه داده‌های وزنی به حجم تبدیل شدند.

#### داروهای مورد استفاده

در تمامی مراحل آزمایش کلیه داروها بصورت داخل صفاقی در حجم ۰/۱ ml و یا بصورت کف پای در حجم ۲۰ μl تزریق شد.

مرفین سولفات (Temad co. Iran) در دوزهای ۰/۱ mg/kg، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷، ۰/۸ در حلال نرمال سالیین تهیه و در تمامی آزمایشات ۴۵ دقیقه قبل از تزریق کاراژینان مورد استفاده قرار گرفت.

نالوکسان هیدروکلراید (Sigma co. UK) در حلال نرمال سالیین تهیه و در دوزهای ۰/۱۰ mg/kg و ۰/۲۰ mg/kg ۴۵ دقیقه قبل و ۱۶۵ دقیقه بعد از تزریق کاراژینان بصورت داخل صفاقی و در دوز ۲ mg/kg بصورت کف پای ۵ دقیقه قبل از تزریق کاراژینان تجویز شد.

آنتی α IL-1 در دوزهای ۲۸ و ۱۴ μg/mice و ۷ بصورت داخل صفاقی در زمان ۳۰ دقیقه قبل از تزریق کاراژینان تزریق گردید و در گروه‌های کنترل نیز بصورت مشابه از حلال Phosphate Bafer Saline (PBS) تزریق شد.

#### اندازه‌گیری سطوح سرمی اینترلوکین-۱

سطوح سرمی α IL-1 با استفاده از کیت‌های اختصاصی و به روش الیزا مطابق دستورالعمل‌های ذکر شده از طرف کارخانه سازنده (Biotrack co. UK) اندازه‌گیری شد. حساسیت حداقل کیت‌های مورد استفاده در مورد α IL-1 به میزان ۶ pg/ml بود.

#### تهیه و نگهداری سرم

خونگیری از حیوان در زمان‌های مشاهده حداکثر اثر ضدالتهابی یا مشاهده حداکثر اثر التهابی به روش قطع گردن انجام گرفت. پس از جمع‌آوری خون و لخته شدن آن به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید و سرم در لوله‌های پلی‌پروپیلن جمع‌آوری و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد جهت اندازه‌گیری α IL-1 نگهداری شد.

گزارشات متعددی در مورد تداخل اوبیوئیدها و سایتوکین‌ها بخصوص IL-1 منتشر شده است. افزایش محل‌های اتصال α IL-1 در التهابات محیطی (۶) و مهار تولید α IL-1 و TNF-α توسط ماکروفاژهای صفاقی موش در مصرف مرفین (۲۵) و همچنین ایجاد پردردی در موش از طریق تزریق داخل نخاعی α IL-1 و مهار آن با تزریق داخل صفاقی مرفین (۲۶) و قطع محور مغز-هیپوتالاموس-هیپوفیز-فوق کلیوی توسط α IL-1 در تجویز مزمن مرفین (۲۷) و نیز کاهش بروز آنزیم معکوس کننده α IL-1 بدنبال تجویز مزمن مرفین (۲۸) نشان داده شده است.

در واقع ارتباطات بین سیستم اوبیوئیدی-درد-پاسخ ایمنی بسیار پیچیده و با اهمیت هستند (۱۱).

هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات مرفین در تجویز حاد و سیستمیک بر التهاب ناشی از کاراژینان و ارزیابی این اثرات در هنگام تجویز نالوکسان و بررسی مکانیسم‌های مطرح در این رابطه می‌باشد. از طرف دیگر با توجه به اینکه سایتوکین‌ها در تنظیم پاسخ‌های التهابی و ایمنی دخیل بوده و در این میان α IL-1 نقش مهمی را در حالت‌های التهابی دارد در مطالعه حاضر به بررسی نقش α IL-1 در اثرات ضد التهابی مرفین پرداخته شده است.

## مواد و روشها

مطالعه حاضر از نوع آزمایشگاهی است که در طی سال ۱۳۷۹ در گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام گرفته است.

#### حیوانات مورد آزمایش

تمامی آزمایشات بر روی موش سوری نر از نژاد NMRI با وزن ۲۵-۳۰ g در دمای اطاق انجام شد و حیوانات به آب و غذای کافی دسترسی داشتند.

اصول اخلاقی توصیه شده توسط انجمن بین‌المللی درد برای کار بر روی حیوان در این مطالعه مورد ملاحظه قرار گرفت (۲۹).

#### ایجاد و ارزیابی التهاب

التهاب با تزریق کف پای لامبداکاراژینان (Sigma co. Canada) به میزان ۰/۰۵ ml از محلول ۳ w/v درصد در حلال نرمال سالیین (۳۰) در کف پای راست حیوان ایجاد

تزریق کارازینان در دوز ۱۰ mg/kg, i.p. موجب افزایش اثرات التهابی کارازینان در ۱ ساعت ابتدای آزمایش گردید (شکل ۴). همچنین پیش درمانی با تزریق کف پای نالوکسان در ۵ دقیقه پیش از تزریق کارازینان در دوز ۲ mg/kg, i.p. اثری بر التهاب ناشی از کارازینان نداشت (شکل ۵).

#### اندازه‌گیری سطوح سرمی IL-1 $\alpha$ در گروه‌های کنترل، مرفین، کارازینان و مرفین به همراه کارازینان

سطح سرمی IL-1 $\alpha$  در گروه کنترل ۱۲۳/۹۷ pg/ml بود. پیش درمانی با مرفین ۷ mg/kg, i.p. موجب کاهش سطح سرمی IL-1 $\alpha$  به ۹۷/۱۷ pg/ml گردید. سطح سرمی IL-1 $\alpha$  در گروه تحت تزریق کارازینان ۱۰۹/۹۲ pg/ml بود در حالی که تزریق مرفین به همراه کارازینان موجب افزایش سطح سرمی IL-1 $\alpha$  به ۱۹۱/۱۴ pg/ml گردید که در مقایسه با گروه کنترل به میزان  $p < 0.05$  و در مقایسه با گروه کارازینان به میزان  $p < 0.01$  بود. هیچگونه اختلاف معنی‌داری بین سطح سرمی IL-1 $\alpha$  در گروه‌های مرفین و کارازینان با کنترل دیده نشد (شکل ۶).

#### اندازه‌گیری سطوح سرمی IL-1 $\alpha$ در گروه‌های کنترل، مرفین، مرفین به همراه کارازینان و مرفین به همراه کارازینان و نالوکسان

پیش درمانی با نالوکسان موجب کاهش سطح سرمی IL-1 $\alpha$  از ۱۹۱/۱۴ pg/ml در گروه مرفین به همراه کارازینان به ۱۱۷/۷۷ pg/ml در گروه گیرنده نالوکسان گردید. مقایسه گروه گیرنده نالوکسان با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ولی در مقایسه با گروه گیرنده مرفین به همراه کارازینان به میزان  $p < 0.01$  اختلاف معنی‌دار بود (شکل ۷).

#### اثرات تزریق آنتی‌بادی بر اثرات ضد التهابی مرفین

تزریق داخل صفاقی آنتی IL-1 $\alpha$  در دوز ۷  $\mu$ g/mice موجب خنثی شدن اثر ضد التهابی مرفین در ۳ ساعت ابتدای آزمایش و افزایش التهاب در ۳ ساعت پایان آزمایش ( $p < 0.05$ ) گردید. تزریق داخل صفاقی آنتی IL-1 $\alpha$  در دوزهای ۱۴ و ۲۸  $\mu$ g/mice موجب خنثی شدن اثر ضد التهابی مرفین بطور کامل گردید (شکل ۸).

#### آنالیز آماری

آنالیز آماری داده‌های بدست آمده با استفاده از روش un paired student-t test انجام و  $p < 0.05$  به عنوان اختلاف معنی‌دار مورد پذیرش قرار گرفت.

## یافته‌ها

#### اثر مرفین بر التهاب ناشی از کارازینان

اثر التهابی کارازینان (۰/۰۵ ml) در تزریق کف پای در مقایسه با گروه کنترل ۳۰ دقیقه پس از تزریق ظاهر و در ساعات ۳-۴ به حداکثر خود می‌رسد ( $p < 0.001$ ) و سپس بتدریج کاهش می‌یابد (گراف گروه کنترل نشان داده نشده است). پیش درمانی با مرفین ۱ mg/kg, i.p. موجب افزایش معنی‌دار التهاب در پای تحت تزریق در مقایسه با گروه کنترل گردید و پیش درمانی با دوز ۳ mg/kg, i.p. اثری بر التهاب نداشت در حالی که تجویز مرفین در دوز ۵ mg/kg, i.p. موجب کاهش التهاب فقط در ۲ ساعت اول آزمایش گردید (شکل ۱).

پیش درمانی با مرفین ۷ mg/kg, i.p. موجب کاهش معنی‌دار التهاب در پای تحت تزریق در ساعات ۲-۶ در مقایسه با گروه کنترل گردید حداکثر اثر نیز در ساعت سوم پس از تزریق مشاهده شد ( $p < 0.01$ ) (شکل ۲).

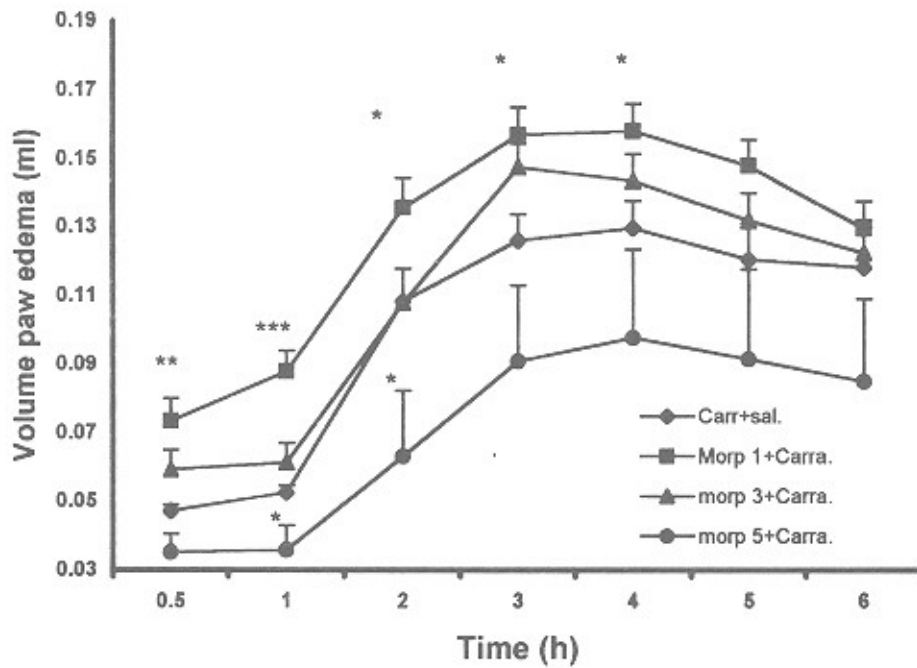
تکرار آزمایش با دوز ۱۰ mg/kg, i.p. مرفین تفاوت معنی‌داری را با دوز ۷ mg/kg, i.p. نشان نداد و به همین خاطر آزمایشات با دوز ۷ mg/kg, i.p. دنبال شد (گراف نشان داده نشده است).

#### اثر نالوکسان بر اثر ضد التهابی مرفین

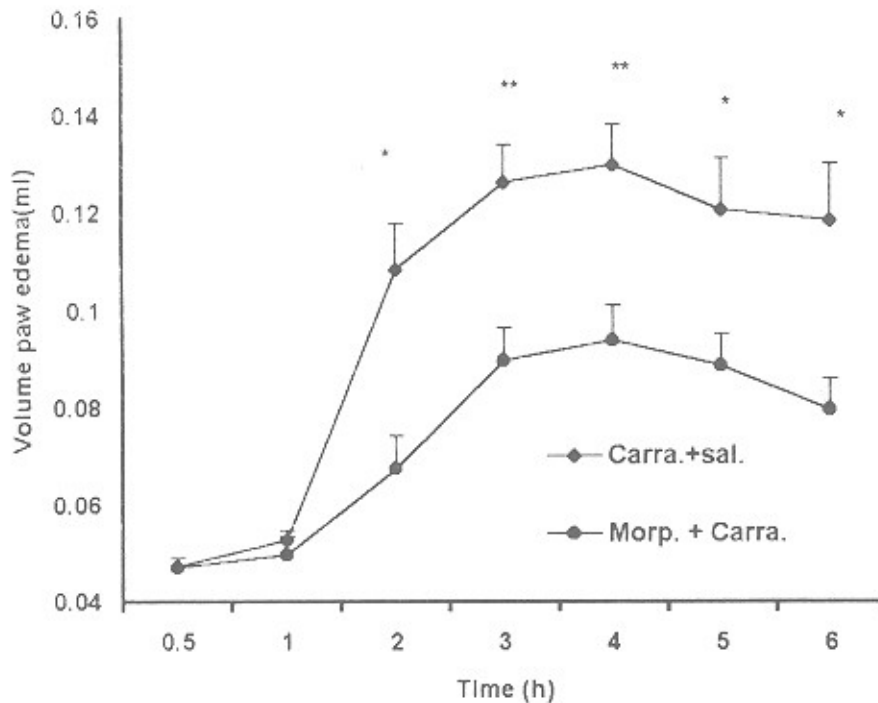
پیش درمانی با نالوکسان در ۴۵ دقیقه پیش از تزریق کارازینان در دوز ۲ mg/kg, p.i. و در دقیقه ۱۶۵ پس از تزریق کارازینان در دوز ۱۰ mg/kg, i.p. موجب خنثی شدن اثرات ضد التهابی مرفین گردید (شکل ۳).

#### اثر نالوکسان بر التهاب ناشی از کارازینان

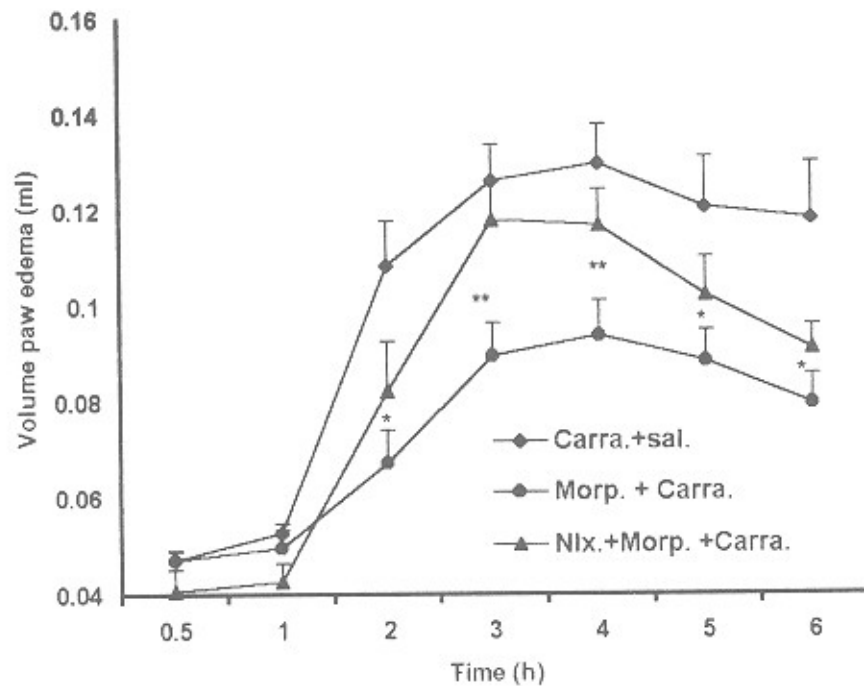
پیش درمانی با تزریق داخل صفاقی نالوکسان در ۴۵ دقیقه پیش از تزریق کارازینان در دوز ۲ mg/kg, i.p. و در دقیقه ۱۶۵ پس از



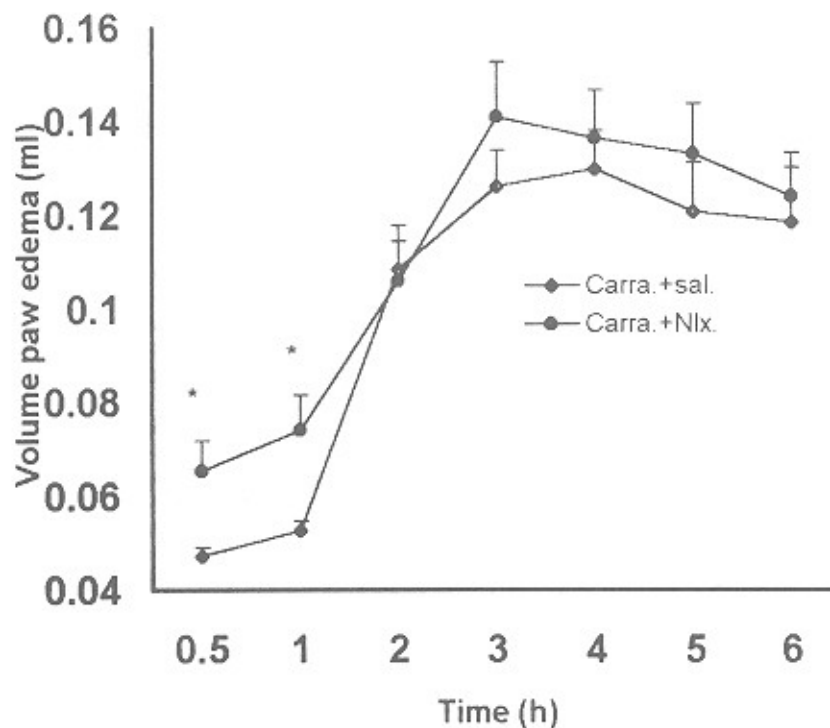
شکل ۱- اثر تزریق داخل صفاقی مرفین در روزهای ۵، ۳ و ۱ mg/kg بر التهاب ناشی از کارازینان در موش سوری نر (n=7). دادهها بصورت Mean±S.E.M بیان شده‌اند. \* $p < /0.05$ ، \*\* $p < /0.01$ ، \*\*\* $p < /0.001$  نشان دهنده اختلاف معنی‌دار یا گروه تحت تزریق کارازینان و سالین می‌باشد.



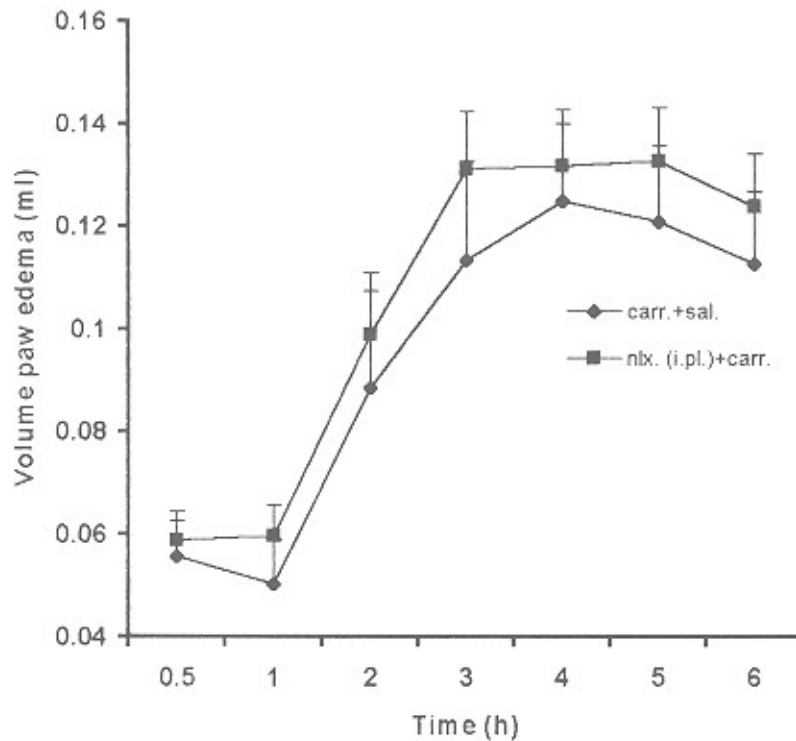
شکل ۲- اثر تزریق داخل صفاقی مرفین در دوز ۷ mg/kg بر التهاب ناشی از کارازینان در موش سوری نر (n=7). داده ها بصورت Mean±S.E.M بیان شده‌اند. \* $p < /0.05$  و \*\* $p < /0.01$  نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه تحت تزریق کارازینان و سالین می‌باشد.



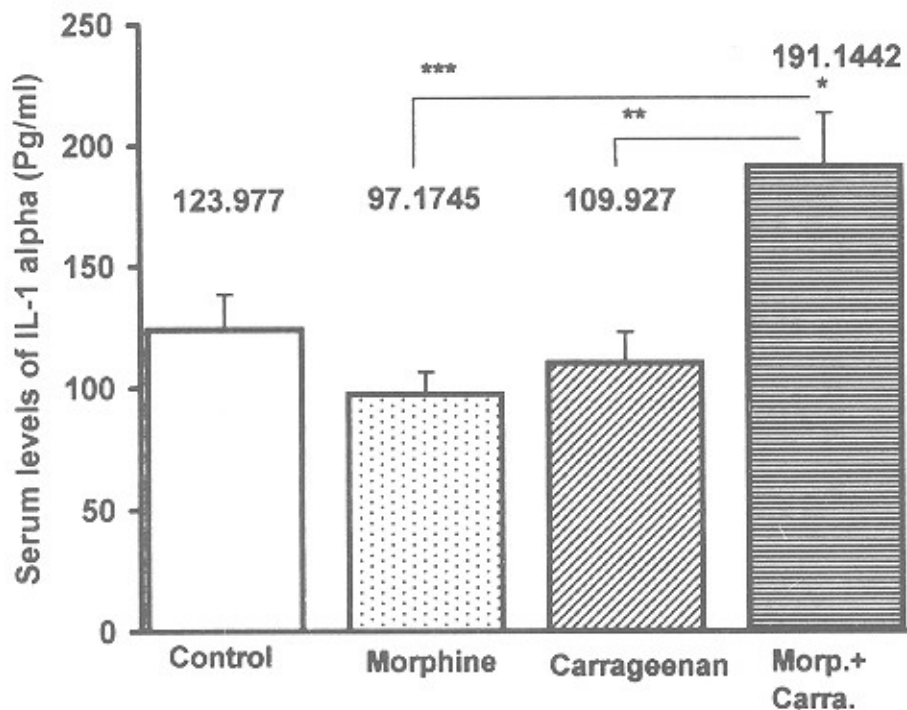
شکل ۳- اثر تزریق داخل صفاقی نالوکسان در دوزهای ۱۰ و ۲ mg/kg به ترتیب ۴۵ دقیقه قبل و ۱۶۵ دقیقه بعد از تزریق کارائینان بر اثر ضد التهابی ناشی از مرفن در موش سوری نر (n=۷). داده ها بصورت Mean±S.E.M بیان شده‌اند.  $p < 0.05$  و  $p < 0.01$  نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه



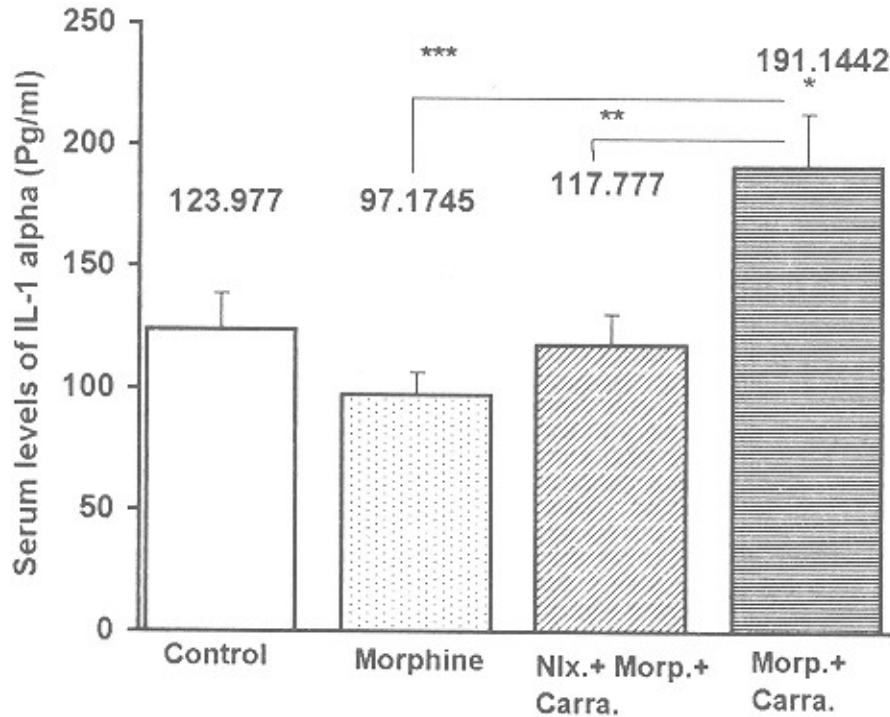
شکل ۴- اثر تزریق داخل صفاقی نالوکسان در دوزهای ۲ mg/kg، پنج دقیقه قبل از تزریق کارائینان و در دوز ۱۰، ۱۶۵ دقیقه پس از تزریق کارائینان بر اثر التهاب‌زایی ناشی از تزریق کف پای کارائینان در موش سوری نر (n=۷). داده ها بصورت Mean±S.E.M بیان شده‌اند.  $p < 0.05$  نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه تحت تزریق کارائینان و سالیین می‌باشد.



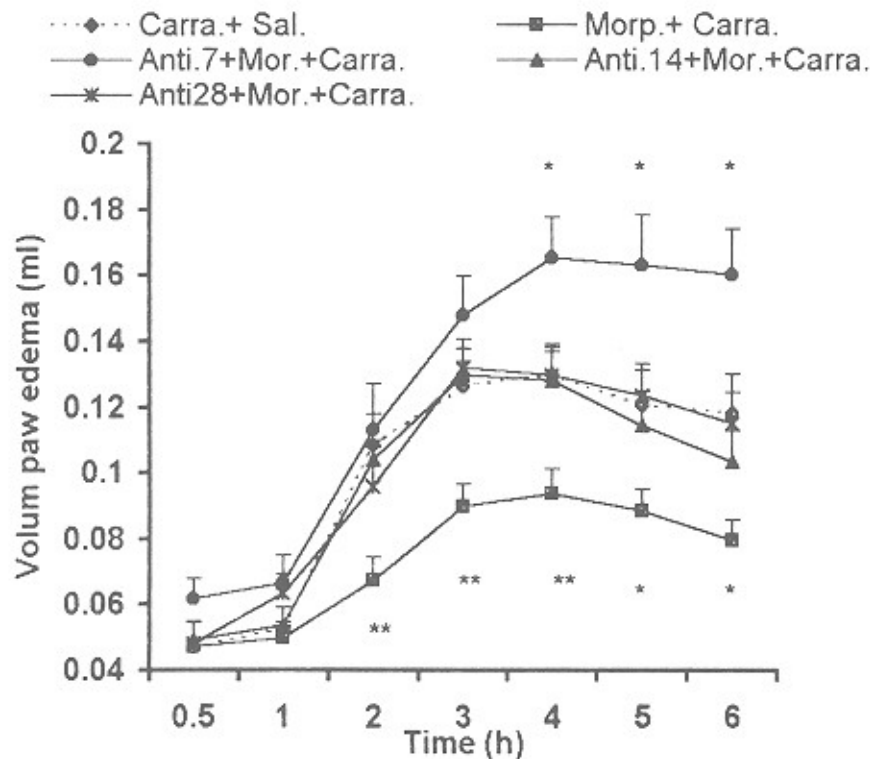
شکل ۵- اثر تزریق کف پایي نالوکسان در دوز ۲ mg/kg در ۵ دقیقه قبل از تزریق کارائینان بر اثر التهابی ناشی از تزریق کف پایي کارائینان در موش سوری نر (n=۷). داده ها بصورت Mean±S.E.M. بیان شده‌اند.



شکل ۶- بررسی سطوح سرمی IL-1α در گروههای کنترل، مرفین (7 mg/kg, i.p.)، کارائینان (0.05ml, i.pl.) و مرفین به همراه کارائینان در موش سوری نر (n=۱۲). داده ها بصورت Mean±S.E.M. بیان شده‌اند.  $p < 0.001$ ،  $p < 0.01$ ،  $p < 0.05$  نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل یا سایر گروه ها می‌باشد.



شکل ۷- بررسی سطوح سرمی IL-1 $\alpha$  در گروه های کنترل، مرفین (7 mg/kg, i.p.)، مرفین و کارازینان به همراه نالوکسان و مرفین به همراه کارازینان در موش سوری نر (n=15). در گروه مرفین و کارازینان به همراه نالوکسان و (n=12) در سایر گروه ها، داده ها بصورت Mean $\pm$ S.E.M بیان شده اند. \*p<0.05، \*\*p<0.01، \*\*\*p<0.001 نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل یا سایر گروه ها می باشد.



شکل ۸- اثر تزریق داخل صفاقی آنتی بادی IL-1 $\alpha$  در دوزهای 7، 14 و 28  $\mu$ g/mice بر اثر ضد التهابی ناشی از مرفین (7mg/kg) در موش سوری نر (n=7). داده ها بصورت Mean $\pm$ S.E.M بیان شده اند. \*p<0.05 و \*\*p<0.01 نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه تحت تزریق کارازینان و سالین می باشد.



## بحث

### اثرات مرفین بر التهاب ناشی از کاراژینان

مرفین به عنوان سر گروه آگونیست‌های رسپتور  $\mu$  و بعنوان داروی انتخابی برای تسکین دردهای حاد و مزمن بکار رفته است. مکانیسم عمل مرفین در ایجاد تسکین درد به اثرات آن در سیستم عصبی مرکزی (CNS) منتسب شده است ولی امروزه مشخص شده است که مرفین علاوه بر آثار مرکزی دارای آثار محیطی نیز بوده و در بافتهای صدمه دیده و ملتهب واجد آثار تسکینی می‌باشد (۳۲). در واقع مصرف موضعی اپیونیدها جهت تسکین دردهای موضعی التهابی در سالهای اخیر موجب تحوسی در مصرف اپیونیدها شده است.

رسپتور های اپیونیدی  $\mu$  بطور گسترده‌ای در سیستم ایمنی توزیع شده و گزارشاتی مبنی بر توانایی مرفین و پپتیدهای اپیونیدی در تغییر عملکرد سیستم ایمنی وجود دارد (۳۳). شواهدی مثل افزایش رسپتورهای اپیونیدی در طی التهاب (۱) و افزایش مقادیر پپتیدهای اپیونیدی در سلولهای ایمنی منتشر در بافتهای ملتهب (۵) و افزایش (up regulation) محل‌های اتصال برای عوامل آزاد کننده پپتیدهای اپیونیدی مثل Corticotropin Releasing Hormone (CRH) و افزایش رسپتورهای اپیونیدی کاپا در طی التهاب (۳۲) نشانگر آنست که ارتباط نزدیکی بین سیستم ایمنی و اپیونیدی می‌باشد بطوریکه مجموعه سیستم ایمنی و نرواندوکراین و سیستم عصبی مرکزی (Neuro-immuno-endocrine) به عنوان سیستم برتر نامگذاری شده است (۳۴).

از طرف دیگر با توجه به اینکه منبع قابل تصور برای اپیونیدهای اندوزن در بافت‌های التهابی سیستم ایمنی بوده و سلولهای ایمنی حاوی و آزاد کننده پپتیدهای اپیونیدی بوده و گونه‌های مختلفی از این سلولها در محل التهاب تجمع پیدا می‌کنند (۵) و این پپتیدها با اثر بر رسپتورهای اپیونیدی موجود بر روی نرون‌های حسی محیطی موجب ایجاد بی‌دردی می‌شوند (۳۶) نشان می‌دهد که اپیونیدها در قسمتی از این مجموعه در تنظیم هموستاز اجزای ایمنی نقش دارند (۳۷).

افزایش توان مرفین در کاهش حرکات روده در التهاب روده ناشی از روغن پنبه دانه و معکوس شدن این اثرات در تزریق نالوکسان (۳۸) شاهد دیگری د، اثرات مرفین در حالات التهابی

می‌باشد. بهمین خاطر مهار درد توسط اپیونیدها به اثر این ترکیبات بر فعالیت سیستم ایمنی علاوه بر اثرات آنها بر سیستم عصبی مطرح شده است (۳۹).

در فاز اول مطالعه حاضر تزریق کف پای کاراژینان موجب ایجاد التهاب در پای تحت تزریق گردید که این التهاب در ساعات ۳-۴ به حداکثر خود رسید و سپس به تدریج کاهش یافت که این نتایج در مطالعات دیگر محققین نیز گزارش شده است (۳۰، ۴۰، ۴۱، ۴۲، ۴۳).

در بررسی اثرات مرفین، تجویز داخل صفاقی آن در دوز ۱ mg/kg موجب افزایش التهاب ناشی از کاراژینان گردید ولی تزریق دوزهای ۳-۵ mg/kg اثر چندانی بر التهاب ناشی از کاراژینان نداشت (شکل ۱). در حالی که تجویز مرفین در دوز ۷ mg/kg موجب کاهش معنی دار التهاب در طی آزمایش گردید (شکل ۲) و حداکثر اثر نیز در هنگام وقوع حداکثر اثر التهابی کاراژینان مشاهده شد. تجویز مرفین در دوز ۱۰ mg/kg تفاوت معنی‌داری با دوز ۷ mg/kg نداشت و به همین خاطر ادامه آزمایشات با دوز ۷ mg/kg دنبال شد.

نتایج حاصل نشانگر اثر ضد التهابی مرفین در دوز ۷ mg/kg بود که در گزارشات منتشر شده توسط (۸، ۲۵) به آن اشاره شده است. نتایج مطالعه حاضر با نتایج سایر مطالعات انجام شده در مورد اثرات پیش التهابی مرفین در دوز کم (۴۳) و نیز تمایل اپیونیدها به سرکوب سیستم ایمنی (۴۴) و افزایش یا سرکوب ایمنی سلولی و هومورال در مصرف in-vitro پپتیدهای اپیونیدی (۹) همخوانی دارد.

برای توضیح اثرات ضدالتهابی محیطی مرفین مکانیسم‌هایی شامل حضور محل‌های اتصال اپیونیدها بر روی سلولهای ایمنی (۴۳) و مهار تولید  $TNF-\alpha$  (۶)، جلوگیری از ساخت و یا آزاد شدن واسطه‌های التهابی مثل برخی از سایتوکین‌ها (۱) و کاهش التهاب از طریق اثر بر فعالیت لکوسیت‌ها (۳۶) و مونوسیت-ماکروفاژها (۳۷) ارائه شده است. مکانیسم‌های دیگری مثل افزایش نفوذپذیری سدهای عصبی (Preneurial barriers) و متعاقب آن تسهیل دسترسی به رسپتورهای اپیونیدی در اعصاب محیطی و نیز افزایش انتقال رسپتورهای اپیونیدی به پایانه اعصاب محیطی و یا افزایش جفت شدن رسپتورهای اپیونیدی به پروتئین G نیز بیان شده است (۴۳).

هر چند مکانیسم اثرات مرفین بر تنظیم سیستم ایمنی هنوز بطور کامل شناخته نشده است (۱۱) ولی برخی مطالعات پیشنهاد کرده‌اند که اثرات ایمونومدولاتوری مرفین احتمالاً از طریق مکانیسم‌هایی که اثرات ضد دردی را اعمال می‌کنند نمی‌باشد. تفکیک این اثرات هنگامی مشخص گردید که مرفین به درون هیپوفیز پیشین تزریق شد و نتایج نشان دادند که احتمالاً مسیرهای اوبیوئیدی فوق نخاعی دخیل در اثرات سرکوب ایمنی از مسیرهای دخیل در بی‌دردی مرفین مجزا هستند و علاوه بر این اثر مرفین بر فعالیت ایمنی از طریق مکانیسم‌های غیر اوبیوئیدی نیز احتمالاً دخیل می‌باشد (۱۱).

### بررسی سطوح سرمی IL-1 در گروه‌های مختلف

شواهد زیادی وجود دارد که عملکرد سیستم‌های ایمنی عصبی و اندوکراین با هم مرتبط هستند و اخیراً توجه زیادی به چگونگی ارتباط میان سایتوکین‌ها و نوروترانسمیترها و هورمونهای پپتیدی معطوف شده است.

سایتوکین‌ها نقش مهمی در هماهنگ سازی و کنترل روندهای حیاتی دارند (۴۶) و در نشانه‌پردازی (Signaling) میان سلولها در طی پاسخ‌های ایمنی درگیر هستند (۴۷). در میان سایتوکین‌ها IL-1 یک عامل قدرتمند در ارتباط میان سیستم ایمنی عصبی و اندوکراین می‌باشد (۴۸).

IL-1 عموماً به عنوان یک عامل پیش التهابی که موجب بروز علائم بیماری و التهاب مثل هیپرترمی (۴۹) بیزاری از مزه جدید در حیوانات (۵۰) التهاب ریوی (۵۱)، التهاب مثانه (۵۲)، التهاب لته (۵۳)، پر دردی (۵۴) و تب (۳۹) می‌شود شناخته شده است. ولی گزارشات دیگری در خصوص اعمال متضاد این سایتوکین مثل مهار درد (۷) و ایجاد بی‌دردی (۲۳) و القای تولید سایتوکین‌های ضد التهابی مثل IL-1ra, IL-1 receptor antagonist, IL-4, IL-6 و کاهش رسپتورهای TNF و IL-1 (۵۵) نیز منتشر شده است. برخی سایتوکین‌ها و از جمله IL-1 که از ماکروفاژهای فعال شده و مونوسیت‌ها در طی عفونت آزاد می‌شوند نقش مهمی را در پاسخ‌های التهابی حاد بازی می‌کنند (۳۶) با این وجود سهم نسبی IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  در پاسخ‌های التهابی بخوبی روشن نشده است.

چندین گزارش نیز در مورد اثرات محافظتی IL-1 در برخی حالات مثل عفونت مایکوباکتریال (۲۰) و سمیت کبدی ناشی از استامینوفن (۵۶) و همچنین اثرات بالقوه ضد تومورال IL-1 $\alpha$  در کارسینومای سلولهای مخاطی Squamous cell carcinoma

نتایج مطالعه حاضر در مورد اثرات دوگانه التهابی مرفین در دوز ۱ mg/kg و اثر ضد التهابی مرفین در دوز ۷ mg/kg (شکل ۱ و ۲) نشانگر اثرات متفاوت اوبیوئیدها در دوزهای مختلف می‌باشد. نتایج مشابهی در خصوص اثرات دردزایی مرفین در دوز ۰/۱ mg/kg و اثرات ضد دردی آن در دوزهای دیگر در آزمایش Tail Flick گزارش شده است (۴۵) هر چند اثرات ضد دردی مرفین در طول تاریخ شناخته شده است. توضیحاتی نظیر درگیر بودن رسپتورهای متفاوت برای اثرات اوبیوئیدهای اندوژن و آگزوژن در توجیه این اثرات بیان شده است.

پیش درمانی با تجویز داخل صفاقی نالوکسان ۲۰۱۰ mg/kg موجب خنثی شدن اثرات ضد التهابی مرفین گردید که نشان می‌دهد که اثرات مرفین از طریق رسپتورهای کلاسیک اعمال می‌شود (شکل ۳).

برای بررسی اثرات اوبیوئیدهای پپتیدی درونزا (EOP) بر التهاب ناشی از کاراژینان از تزریق نالوکسان سیستمیک و موضعی استفاده شد. تجویز نالوکسان بصورت سیستمیک داخل صفاقی در دوز ۲۰۱۰ mg/kg در زمان‌های ۴۵ دقیقه قبل از تزریق کاراژینان و ۱۶۵ دقیقه پس از تزریق کاراژینان موجب افزایش التهاب ناشی از کاراژینان در یک ساعت اول آزمایش گردید (شکل ۴) در صورتی که تزریق نالوکسان بصورت کف پایی در دوز ۲ mg/kg در زمان ۵ دقیقه قبل از تزریق کاراژینان اثر معنی‌داری بر التهاب ناشی از کاراژینان نداشت (شکل ۵) که نشانگر آنست که اوبیوئیدهای پپتیدی درونزا (EOP) سیستمیک در کنترل میزان التهاب نقش دارند ولی اوبیوئیدهای پپتیدی درونزا (EOP) موضعی به تنهایی نقش چندانی در تنظیم اثرات التهابی کاراژینان ندارند.

فقدان اثرات نالوکسان سیستمیک بر التهاب کاراژینان پس از یک ساعت اول آزمایش نشان می‌دهد که عوامل دیگری بجز EOP از طریق اثر بر رسپتورهای اوبیوئیدی و یا سایر عوامل دخیل در پروسه‌های التهابی در کنترل روند ایجاد التهاب توسط کاراژینان نقش دارند.

گزارشات منتشر شده در مورد کاهش هیپرترمی و نشت مایعات عروقی ناشی از کاراژینان توسط مرفین (۸) و مهار کننده IL-1 $\alpha$  و TNF- $\alpha$  توسط ماکروفاژهای پری‌توان موش در مصرف مرفین (۲۵) بیانگر آثار ضد التهابی مرفین می‌باشد که در مطالعه حاضر نیز مشاهده شد.

از طریق افزایش سطح سرمی IL-1 موجب کنترل روند التهاب و ایجاد اثرات ضد التهابی شده است.

این مسئله پذیرفته شده است که سیستم ایمنی فعال از طریق آزاد کردن ساینوکین‌های پیش التهابی با CNS ارتباط دارد (۳۹) و پاسخ‌های ایمنی ناشی از IL-1 می‌تواند توسط اوبیوئیدهای اگزوزن تحت تأثیر قرار گیرد (۲۷) و از طرف دیگر IL-1 بعنوان یکی از عوامل تحریک محور هیپوتالاموس - هیپوفیز - فوق کلیه (HPA) که موجب آزاد شدن کورتیکواستروئیدها می‌شوند شناخته شده است. همچنین اعمال دیگری مثل اثرات محافظتی IL-1 در صدمات معدی ناشی از آسیب‌رین گزارش شده است (۶۱).

با توجه به گزارشات موجود و نتایج بدست آمده از فاز اول مطالعه حاضر نقش احتمالی IL-1 به عنوان واسطه اثرات ضد التهابی مرفین مطرح می‌گردد.

همچنین با توجه به افزایش سنتز IL-1ra در هنگام تجویز داخل بطن مغزی (i.c.v.) IL-1 (۶۲) و نقش شناخته شده تعادل میان IL-1 و IL-1ra در تعیین میزان التهاب (۶۳) این احتمال وجود دارد که افزایش سطح سرمی IL-1 از طریق افزایش سطح IL-1ra و یا سایر ساینوکین‌های ضد التهابی موجب کاهش التهاب ناشی از کاراژینان شده باشد. این احتمال نیز وجود دارد که IL-1 در دوزهای مختلف و یا حالات مختلف اثرات متفاوتی را از خود نشان دهد برای مثال ممکن است این ساینوکین به تنهایی نقش التهابی داشته باشد ولی در حضور حالات التهابی از طریق فیدبک منفی موجب کاهش آزادی و با کاهش تولید سایر ساینوکین‌های پیش التهابی شده و در نهایت موجب مهار التهاب شده باشد.

#### بررسی اثرات تجویز آنتی‌بادی IL-1 بر اثر ضد التهابی

##### مرفین

دو زیر گروه IL-1 $\alpha$  و IL-1 $\beta$  برای IL-1 شناخته شده است که از نظر ساختمانی شبیه به هم بوده و فعالیت بیولوژیکی شبیه به هم نیز دارند (۶۴) ولی اختلافاتی نیز در فعالیت بیولوژیکی آنها وجود دارد.

در مطالعه حاضر تجویز داخل صفاقی آنتی‌بادی IL-1 $\alpha$  در دوز ۷  $\mu\text{g}/\text{mouse}$  موجب افزایش ادم کف پای ناشی از کاراژینان در ساعات ۴-۶ آزمایش گردید در حالی که تجویز آنتی‌بادی در دوزهای ۱۴ و ۲۸  $\mu\text{g}/\text{mouse}$  موجب حذف اثرات ضد التهابی مرفین گردید (شکل ۸).

خنثی شدن ناقص IL-1 $\alpha$  در تجویز مقادیر ناکافی آنتی‌بادی می‌تواند یک مکانیسم احتمالی در توضیح افزایش ادم در دوز

پیشرفته در موش (۲۴) منتشر شده است. کارلسون و همکارانش نیز اثرات نوپروئکتیو IL-1 $\alpha$  را در سیستم عصبی مرکزی نشان داده‌اند (۵۷).

در مطالعه حاضر تعیین سطوح سرمی IL-1 در گروه‌های مختلف نشان دهنده افزایش معنی‌دار سطح سرمی IL-1 $\alpha$  در گروه دریافت کننده مرفین و کاراژینان نسبت به گروه‌های دریافت کننده مرفین یا کاراژینان و کنترل بود (شکل ۶). پیش درمانی با نالوکسان موجب کاهش سطح سرمی IL-1 به حدود سطح سرمی در گروه کنترل گردید (شکل ۷).

همزمانی مشاهده اثر ضد التهابی مرفین در دوز ۷ mg/kg و افزایش معنی‌دار سطح سرمی IL-1 $\alpha$  در آن زمان نشان می‌دهد که احتمالاً مکانیسم اثر ضد التهابی مرفین از طریق افزایش سطح سرمی IL-1 واسطه‌گری می‌شود. کاهش سطح سرمی این ساینوکین‌ها در تجویز نالوکسان و حذف اثر ضد التهابی مرفین در همین گروه‌ها تقویت کننده این فرضیه می‌باشد که افزایش سطح سرمی IL-1 واسطه اثر ضد التهابی مرفین می‌باشد و این پدیده ممکن است قسمتی از پاسخ دفاعی بدن برای جبران حالت التهابی در بدن باشد.

با توجه به این مسئله که سیستم ایمنی از طریق آزاد کردن ساینوکین‌های پیش التهابی با CNS ارتباط برقرار می‌کند (۵۸) و با توجه به حضور فراوان و اختصاصی رسپتورهای IL-1 بر روی سلولهای التهابی (۶) و نقش مهم این ساینوکین در تحریک مسیر هیپوتالاموس - هیپوفیز - فوق کلیوی (۵۹) ممکن است که افزایش سطح سرمی IL-1 باعث افزایش تولید و آزاد شدن گلوکوکورتیکوئیدها و سرانجام موجب سرکوب التهاب ناشی از کاراژینان شده باشد.

دسترسی IL-1 محیطی به CNS همواره با تردید همراه بوده است ولی دسترسی از طریق ساختمان‌های circumventricular انتقال فعال و نیز القای تولید IL-1 مرکزی توسط IL-1 محیطی پیشنهاد گردیده است (۶۰). مکانیسم دیگری که برای ارتباط بین افزایش سطح سرمی IL-1 و بروز اثرات ضد التهابی مرفین پیشنهاد می‌گردد این است که با توجه به این که ساینوکین‌ها نقش مهمی در تنظیم و کنترل روندهای التهابی بازی می‌کنند (۴۶) و از طرفی حضور IL-1 موجب القای سنتز و آزاد شدن IL-1 بیشتری می‌گردد (۳۹) به نظر می‌رسد که تجویز مرفین به همراه کاراژینان

نتایج مطالعه حاضر نشانگر اثرات دوگانه التهابی و ضد التهابی مرفین بصورت وابسته به دوز بوده و نقش واسطه‌ای IL-1 $\alpha$  را در بروز این اثرات مطرح ساخته و نشان می‌دهد که IL-1 در روندهای التهابی و ضد التهابی به صورت مستقیم یا غیر مستقیم نقش وابسته و از طریق واسطه‌های ایمنی در محیط یا مرکز در کنترل فیزیولوژیک بدن نقش دارد.

۷  $\mu\text{g}/\text{mouse}$  باشد. با توجه به اثرات پیش‌التهابی نسبت داده شده به IL-1 $\alpha$  (۶۵-۶۷) این اثر مشاهده شده می‌تواند توجیه شود. به عبارت دیگر احتمال بروز اثرات متفاوت IL-1 $\alpha$  در سطوح سرمی متفاوت را مطرح می‌نماید کما اینکه گزارشات متعددی در مورد این نقش‌های مختلف گزارش شده است که از جمله می‌توان به دخیل بودن آن در بروز یا مهار درد (۶، ۲۳، ۶۸) اشاره کرد. این نتایج نشان می‌دهند که اثرات ضد التهابی مرفین از طریق سائتوکین IL-1 واسطه‌گری می‌شود.

## منابع

1. Wilson J L, Nayanar V, Walker J S. The site of anti-arthritic action of the  $\kappa$ -opioid, u-50, 488, in adjuvant arthritis: importance of local administration. *Br J Pharmacol.*, 1996; 118: 1754-60.
2. Bider W, Walker JS. Effect of the peripherally selective  $\kappa$ -opioid agonist, asimadoline, on adjuvant arthritis. *B. J. Pharmacol.*, 1998; 124:647-54.
3. Likar R, Sittl R, Gragger K, Pipam W, Blating H, Breschan C, Schalk HV, Stein C, Shafer M. Peripheral morphine analgesia in dental surgery. *Pain*, 1998; 76: 145-50.
4. Kalso E, Tramer MR, Carrll D, Mcquary HJ, Moore RA. Pain relief from intra-articular morphine after knee surgery: a qualitative systematic review. *Pain* 1997; 71:127-34.
5. Stein C, Hassan AH, Ryzewlocki R, Gramsch C, Peter K, Herz A. Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA*; 1990; 87: 5935-39.
6. Mousa S A, Schafer M, Mitchell WM, Hassan AHS, Stein C. Local upregulation of corticotropin-releasing hormone and interleukin-1 receptors in rats

with painful hindlimb inflammation. *Eur J Pharmacol* 1996; 311: 221-31.

7. Schafer M, Carter L, Stein C. Interleukin-1 $\beta$  and corticotropin-releasing factor inhibit pain by releasing opioids from immune cells in inflamed tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4219-23.

8. Joris J, Costello A, Dubner R, Hargreaves KM. Opiates suppress carrageenan- induced edema and hyperthermia at doses that inhibit hyperalgesia. *Pain* 1990; 43: 95-103.

9. Carr DJJ, Serou M. Exogenous and endogenous opioids as biological response modifiers. *Immunopharmacol.* 1995; 31: 59-71.

10. Ramme D, Illes P, Spath L, Starke K. Blockade of alpha-2 adrenoceptors permits the operation of otherwise silent kappa receptors of the sympathetic axons of rabbit jejunal arteries. *Arch. Pharmacol.* 1986; 334: 48-55.

11. Tsai YC, Won SJ, Lin MT. Effects of morphine on immune response in rats with sciatic constriction injury. *Pain* 2000; 88: 155-60.

12. Oppenheim JJ, Ruscetti FW, Foltynnek C. Cytokines. In: Stites DP, Terr AI. *Basic and Clinical Immunology*. PP: 78-101, Prentice-Hall International Inc 1991.

13. Denburg JA. Cytokine networks in allergic disease. In: Holgates ST, Church MK. *Allergy*. PP: 3/1-3/10. Mosby-Wolf, 1993.

14. Male D and Roitt I. Introduction to the immune system. In: Roitt, Brastoff, Male. Immunology. PP: 1/1- 1/11. Mosby,1996.
15. Deleo JA, Yeziarski RP. The role of neuroinflammation and neuroimmune activation in persistent pain. Pain2001; 90: 1-6.
16. Rothwell, NJ, Luheshi, NL. Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. TINS 2000; 23, 12, 618-24.
17. Van de loo FA, Arntz OJ, Van Enckevort FH, Van Lent PL, Van den Berg WB. Reduced cartilage proteoglycan loss during zymosan-induced gonarthrosis in NOS2-deficient mice and in anti-interleukine-1 treated wild-type mice with unabated joint inflammation. Arthriti Rheum 1998; 41:4634-46.
18. Netea MG, Kullberg BJ, Boerman OC, Verschueren I, Dinarello CA, Van der Meer JW. Soluble murine IL-1 receptor type I induces release of constitutive IL-1 alpha. J Immunol 1999; 15, 162: 84876-81.
19. Horai R, Asano M, Sudo K, Kanuka H, Suzuki M, Nishihara M, Takahashi M, Iwakura Y. Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, IL-1alpha/beta, and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1beta is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. J Exp Med 1998; 4; 187(9): 1463-75.
20. Yamada H, Mizomo S, Horai R, Iwakura Y, Sugawara I. Protective role of interleukine-1 in mycobacterial infection in IL-1 alpha/beta double-knockout mice. Lab Invest 2000; 80: 5759-67.
21. Tani-Ishi N, Tsonoda A, Teranaka T, Umemoto T. Autocrine regulation of osteoclast formation and bone resorption by IL-1 alpha and TNF alpha. J Dent Res 1999; 78: 101617-23
22. Zeyse D, Lunenfeld E, Beck M, Prinsloo I, Huleihel M. Induction of interleukin-1 alpha production in murine Sertoli cells by interleukin-1. Biol Reprod 2000; 62: 51291-6.
23. Oka T, Oka K, Hosoi M, Aou S, Hori T. The opposing effects of interleukin-1 $\beta$  microinjected into the preoptic hypothalamus and the ventromedial hypothalamus on nociceptive behavior in rats. Brain Res 1995a; 700:271-278.
24. Grandis JR, Chang MJ, Yu WD, Johnson CS. Antitumor activity of interleukin-1 alpha and cisplatin in a murine model system. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1995; 121: 2197-200.
25. Bian TH, Wanx XF, Li XY. Effect of morphine on interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha production from mouse peritoneal macrophages in vitro. Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao. 1995;16(5): 449-51.
26. Tadano T, Namioka M, Nakagawasai O, Tanno K, Matsushima K, Endo Y, Kisara K. Induction of nociceptive responses by intrathecal injection of interleukin-1 in mice. Life Sci. 1999; 65(3): 255-61.
27. Chang SL, Wu GD, Patel NA, Vidal EL, Fiala M. The effects of interaction between morphine and interleukin-1 on the immune response. Adv Exp Med Biol 1998; 437: 67-72.
28. Wu GD, Graf JA, Zadina JE, Chang SL. The expression of interleukin-1beta converting enzyme (ICE) in rat is decreased following chronic exposure to morphine. Adv. Exp. Med. Biol. 1998; 437: 51-8.
29. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals. Pain1983; 16: 109-10.
30. Escrig V, Ubeda A, Ferrandiz ML, Darias J, Sanchez JM, Alcaraz MJ, Paya M. Variabilin: a dual inhibitor of human secretory and cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> with anti-inflammatory activity. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1997; 228(1): 123-31.
31. Fereidoni M, Ahmadiani A, Semnanian S, Javan M. An accurate and simple method for measurement of paw edema. J Pharmacol Toxicol Method 2000; 43: 1-14.
32. Sengupta JN, Snider A, Su X, Gebhart G F. Effects of kappa opioids in the inflamed rat colon. Pain1999; 79: 175-85.
33. Jessop DS, Major GN, Coventry TL, Kaye SJ, Allison AJ, Harbuz MS. Novel opioid peptides endomorphine-1 and endomorphine-2 are present in mammalian immune tissues. J. Neuroimmune2000; 106: 53-59.
34. Plotnikoff NP. Preface. In: Plotnikoff NP, Faith RE, Murgu AJ, Good RA. Cytokines. CRC Press 1998.
36. Stein C, Millan MJ, Shippenberg TS, Peter K, Herz A. Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Evidence for involvement of mu, delta and kappa receptors. J Pharmacol Exp Ther. 1989; 248 (3): 1269-75.

37. Bencsics A, Elenkov HJ, Vizi ES. Effect of morphine on lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  production in vivo: involvement of the sympathetic nervous system. *J. Neuroimmune.* 1997; 73: 1-6.
38. Pol O, Planas E, Puig MM. Effects of morphine and liposomal morphine in a model of intestinal inflammation in mice. *Pharmacology* 1996; 53(3): 180-9.
39. Watkins LR, Maier S F, Goehler LE. Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. *Pain* 1995a; 63: 289-302.
40. Matsuda H, Dai Y, Ido Y, Ko S, Yoshikawa M, Kubo M. Studies on kochiae fructus III. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of 70% ethanol extract and its component, Momordin Ic from dried fruits of Kochi scoparia L. *Biol Pharm Bull* 1997; 20(10): 1088-91.
41. Gentili ME, Mazoit JX, Samii KK, Fletcher D. The effect of a sciatic nerve block on the development of inflammation in carrageenan injected rats. *Anesth. Analg.* 1999; 89: 4979-84.
42. Oka T, Aou S, Hori T. Intracerebroventricular injection of interleukin- $\beta$  enhances nociceptive neuronal responses of the trigeminal nucleus caudalis in rats. *Brain Res.* 1994; 656: 236-44.
43. Perrot S, Guilbaud G, Kayser V. Effects of intra-plantar morphine on paw edema and pain-related behavior in a rat model of repeated acute inflammation. *Pain* 1999; 83: 249-57.
44. Vergne P, Bertin P, Treves R. Aspirin, pain and inflammation. *Rev. Med. Interne.* 2000; Mar, 21 suppl. 1: 89s-96s.
45. Crain SM, Shen KF. Modulation of opioid analgesia, tolerance and dependence by Gs-coupled, Gm1 ganglioside-regulated opioid receptor functions. *Trend in pharmacol Sci.* 1998; 19: 358-65.
46. Hamblin AS. Cytokines and cytokine receptors, Oxford University Press, pp.62. 1993a.
47. Gomez-Flores R, Weber RJ. Opioids, opioid receptors, and the immune system. In: Plotnikoff NP, Faith RE, Murgu AJ, Good RA, editors. Cytokines, stress and immunity, New York: CRC Press, pp. 286; 1998.
48. Ma XC, Chen LT, Oliver J, Horvath E, Phelps CP. Cytokine and adrenal axis responses to endotoxin. *Brain Res* 2000; 861: 135-42.
49. Watkins LR, Goehler LE, Reiton JK, Tartaglia N, Silberta L, Martin D, Maier SF. Blocked of interleukin-1 induced hyperthermia by subdiaphragmatic vagotomy: evidence for vagal mediation of immune-brain communication. *Neuroscience Lett* 1995b; 183: 27-31.
50. Goehler LE, Busch CR, Tartaglia N, Relton J, Sisk D, Maier SF, Watkins LR. Blockade of cytokine induced conditioned taste aversion by subdiaphragmatic vagotomy: further evidence for vagal mediation of immune-brain communication. *Neurosci Lett* 1995; 185: 163-66.
51. Hybertson BM, Jepson EK, Clarke JH, Spelts RJ, Repine JE. Interleukin-1 stimulates rapid release of Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant (CINC) in rat lungs. *Inflammation* 1996; 20(5): 471-83.
52. Prystowsky JB, Rege RV. Interleukin-1 mediates guinea pig gallbladder inflammation in vivo. *J Surg Res* 1997; 71: 123-6.
53. Biesbrock, A, Yeh, CH. Relationship of surface epithelium concentrations of IL-1 alpha and IL-1 beta to clinical inflammation during experimental gingivitis. *Monogr. Oral. Sci.* 2000; 17, 20-31.
54. Oka T, Oka K, Hosoi M, Hori T. Intracerebroventricular injection of interleukin-6 induces thermal hyperalgesia in rats. *Brain Res* 1995b; 692: 123-28.
55. Natanson C, Hoffman WD, Suffredini AF, Eichacker PQ, Danner RL. Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanisms of pathogenesis. *Ann Intern Med* 1994; 120: 9771-83.
56. Blazka, ME, Elwell, MR, Holladay, SD, Wilson, RE, Luster, MI. Histopathology of acetaminophen-induced liver changes: role of interleukin 1 alpha and tumor necrosis factor alpha. *Toxicol. Pathol.* 1996; 24, 2181-9.
57. Carlson, NG, Wieggl, WA, Chen, J, Bacchi, A, ogers, SW, Gahring, LC. Inflammatory cytokines IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, and TNF-alpha impart neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways. *J. Immunol.* 1999; 163(7): 3963-8.
58. Watkins LR, Goehler LE, Reiton JK, Tartaglia N, Silberta L, Martin D, Maier SF. Blocked of

58. Watkins LR, Goehler LE, Reiton JK, Tartaglia N, Silberta L, Martin D, Maier SF. Blocked of interleukin-1 induced hyperthermia by subdiaphragmatic vagotomy: evidence for vagal mediation of immune-brain communication. *Neuroscience Lett* 1995b; 183: 27-31.
59. Schimmer BP, Parker KL. Adrenocorticotropic hormone; adrenocortical steroids and their synthetic analogs; inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon R, Goodman Gilman A, editors. *Goodman and Gillmans the pharmacological basis of therapeutics*, vol. 59, pp. 619. McGraw-hill Press, New York 1996.
60. Watkins LR, Wiertelak EP, Goehler LE, Smith KB, Martin D, Maier SF. Characterization of cytokine - induced hyperalgesia. *Brain Res* 1994; 654: 15-26.
61. Perretti M, Mugridge KG, Wallace JL, Parente L. Reduction of aspirin-induced gastric damage in rats by interleukin-1 beta: possible involvement of endogenous corticosteroids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992; 261(3): 1238-47.
62. Xiao E, Xia L, Frein M, Wardlaw SL. Intracerebroventricular injection of interleukin-1 stimulates the release of high levels of interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist into peripheral blood in the primate. *J Neuroimmun* 1999; 97(1-2): 70-76.
63. Insel PA. Analgesic-Antipyretic and Anti-inflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon R, Goodman Gilman A, editors. *Goodman and Gillmans the pharmacological basis of therapeutics*, New York: McGraw-hill Press 1996, pp. 619.
64. Hamblin AS. Cytokines and cytokine receptors, Oxford University Press, 1993b; pp. 11.
65. Warren, J.S. Intrapulmonary interleukin 1 mediates acute immune complex alveolitis in the rat. *Biophys. Res. Commun.* 1991; 175, 2604-10.
66. Rege, RV, Prystowsky, JB, Moore, EW. Interleukins mediate the inflammatory response in gallbladder. *Gastroenterology.* 1996; 110, A1303.
67. Prystowsky JB, Rege RV. Interleukin-1 mediates guinea pig gallbladder inflammation in vivo. *J Surg Res* 1997; 71: 123-26.
68. Souter AJ, Garry MG. Spinal interleukin-1 $\beta$  reduces inflammatory pain. *Pain* 2000; 86: 63-68.