مقاله پژوهشی

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۳۳ شماره ۵ آذر و دی ۱۳۹۰ صفحات ۴۹-۴۴

تغییرات میزان پروتئین BDNF طی التهاب ایجاد شده توسط کاراژینان در موش صحرائی نر

حمیرا حاتمی: گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
ابوالحسن احمدیانی: دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، نویسنده رابط:
E-mail: aahmadiani@yahoo.com
نگار سیّد: مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

دریافت: ۸۹/۵/۷ پذیرش: ۸۹/۱۰/۲۹

چکیده

زمینه و اهداف: تعدادی از مطالعات اثرات فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (Brain derived neurotrophic factor, BDNF) را در طی التهاب و آسیب بافتی تشریح نموده اند. اکثر تحقیقات انجام شده روی التهاب نشان می دهند که در زمان التهاب میزان پروتئین BDNF افزایش می یابد. منشأ BDNF سرم به سلولهای ایمنی خون نسبت داده می شود. مشخص شده است گیرنده های اپیوئیدی مرفین نیز در عملکرد سلولهای ایمنی درگیر می شوند. لذا هدف مطالعه حاضر بررسی تغییرات میزان پروتئین BDNF در طی التهاب ایجاد شده توسط کاراژینان و نیز در زمان رفع التهاب توسط مرفین است.

مواد و روش ها: جهت ایجاد التهاب و ارزیابی آن، کاراژینان لامبدا به میزان ۰/۰۵ میلی لیتر به کف پای رت تزریق شده و ورم ناشی از کاراژینان توسط پلتیسمومتر جیوه ای مورد سنجش قرار گرفت.
همچنین جهت بررسی اثر ضد التهابی مرفین، مرفین هیدروکلراید با دوز mg/kg ۷، ۳۰ دقیقه قبل از کاراژینان تزریق شد. نالوکسان هیدروکلراید با تایید اثر اپیوئیدهای درون زا در کاهش ادم، ۱۵۰ دقیقه بعد از تزریق کاراژینان تزریق شد. سطوح سرمی BDNF با روش الایزا مورد سنجش قرار گرفت.

یافته ها: ۴ ساعت بعد از تزریق کاراژینان التهاب به حداکثر میزان خود رسید. پیش تیمار مرفین موجب کاهش التهاب ناشی از کاراژینان شد. همچنین تزریق نالوکسان موجب افزایش التهاب ناشی از کاراژینان در ۲ ساعت ابتدای آزمایش گردید. میزان پروتئین BDNF سرم فقط در گروه دریافت کننده کاراژینان افزایش معنی دار نشان داد.

نتیجه گیری: التهاب ایجاد شده توسط کاراژینان با تغییر سطوح BDNF سرم ارتباط دارد. اما اثرات ضد التهابی مرفین از طریق BDNF میانجی‌گری نمی شود.

کلیدواژه ها: مرفین، کاراژینان، BDNF

مقدمه

مشخص شده نوروتروفین ها در بیماری های خود ایمنی و التهاب درگیر هستند (۲و۱). در پستانداران فاکتورهای نوروتروفیک عبارتند از: فاکتور رشد عصبی، فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز، و نوروتروفین ۳، نوروتروفین ۴ (۳). نورتروفین ها ممکن است به عنوان عوامل اتوکرین یا پاراکرین در پاسخ های التهابی عمل نمایند. (۴). به عنوان مثال مشخص شده سطوح بیان BDNF در سیستم عصبی و در تعدادی از مدلهای درد از جمله التهاب محیطی، آسیب و درد نورپاتیک تغییر می نماید (۶و۵). در مطالعه ای قطع آکسون عصب سیاتیک و ایجاد التهاب سبب افزایش بیان BDNF در نورون های عقده ریشه پشتی نخاع گردیده است (۷). پروتئین BDNF در مسیرهای درد نقش مهمی را ایفاء می‌نماید (۸)، به طوری که ارائه محرک های دردزا سبب

افزایش آزادسازی BDNF و افزایش فسفریلاسیون گیرنده BDNF می گردد (۹). در واقع ممکن است BDNF در انتقال سیناپسی درد، نقش داشته باشد. در حمایت از این فرضیه ارائه آنتاگونسیت BDNF سبب تخفیف التهاب در رت گردیده است (۱۰). بنابراین BDNF به طور ویژه ای ممکن است یک نقش اساسی در شکل پذیری سیناپسی (پلاستی سیتی) در مغز و نیز در سیگنالینگ درد التهابی در شاخه پشتی طناب نخاعی داشته باشد (۱۱).

همچنین در افراد انسانی نیز، مبتلایان به بیماری مالتیپل اسکلروزیس (MS) و انسفالیت دارای سطوح بالایی از BDNF در مغز خود می باشند (۱۲). لذا تغییرات پروتئین BDNF نقش اساسی در التهاب محیطی دارد (۱۳). منشأ BDNF موجود در پلاسمای خون به سلولهای B، سلولهای T و پلاکت ها نسبت داده می شود (۱۶و۱۵و۱۴).

از سوی دیگر مدل التهاب ناشی از کاراژینان (یک پلی گالاکتوز سولفاته با وزن بالا) به عنوان یک الگوی التهاب محیطی در تحقیقات فیزیولوژی مورد استفاده قرار می گیرد. همچنین ارائه مرفین به صورت سیستمیک یا موضعی موجب اثرات ضد التهابی می گردد (۱۸و ۱۷). اثر سرکوب ایمنی ناشی از مرفین می تواند به صورت غیرمستقیم از طریق سیستم عصبی مرکزی و یا تداخل مستقیم با سلولهای ایمنی حاصل شود (۱۹). در هر حال مکانیسم اثر ضدالتهابی مرفین به طور کامل شناخته نشده است. هدف مطالعه حاضر بررسی دو موضوع است:

۱. آیا سطوح BDNF سرم خون طی التهاب ناشی از کاراژینان تغییر می نماید؟

۲. و آیا اثر ضد التهابی مرفین ارتباطی به تغییرات سطوح BDNF سرم خون دارد؟

مواد و روش ها

در این تحقیق تجربی از ۳۵ سر موشهای صحرایی نر بالغ نژاد wistar در محدود وزنی (gr ۲۰۰–۱۹۰) و در ۵ گروه استفاده شد. تعداد جانوران در هر گروه ۷ سر رت بود. جانوران از مرکز نگهداری و پرورش حیوانات آزمایشگاهی وابسته به مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه شهید بهشتی تهیه گردیدند. حیوانات محدودیتی در دسترسی به آب و غذا نداشتند و در شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری می شدند. گروههای مورد آزمایش عبارتند از: گروه کنترل، گروه دریافت کننده مرفین، گروه دریافت کننده کاراژینان، گروه دریافت کننده مرفین+ کاراژینان و گروه دریافت کننده نالوکسان+ مرفین+ کاراژینان. روش ایجاد و سنجش التهاب محیطی به این صورت بود که کاراژینان لامبدا (سیگما) به میزان ۰/۰۵ میلی لیتر از محلول ۳٪ به کف و پای راست حیوان مورد آزمایش تزریق می گردید. جهت کنترل و ارزیابی اثر تزریق به تنهایی ۰/۰۵ میلی لیتر از سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد به کف پای چپ حیوان تزریق می شد. محلول کاراژینان در سرم فیزیولوژی ۲۴ ساعت قبل از آزمایش تهیه می شد. کاراژینان تهیه شده به روش ipl (Interplanetary) به کف پای راست حیوان تزریق می شد و ورم ناشی از التهاب حاصل از کاراژینان با استفاده از پلتیسمومتر جیوه ای مورد سنجش قرار می گرفت (۲۰).

وزن پای موش قبل و بعد از تزریق کاراژینان در ساعات ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ اندازه گیری و سپس با استفاده از جرم حجمی جیوه، داده های وزنی به حجم تبدیل می گردید. تفاوت حجم قبل و بعد از تزریق کاراژینان بیانگر ادم ناشی از التهاب کاراژینان بود. جهت بررسی اثر ضد التهابی مرفین، مرفین هیدروکلراید (سیگما) با دوز ۷ mg/kg به شیوه درون صفاقی و ۳۰ دقیقه قبل از تزریق کاراژینان به جانوران تزریق گردید. همچنین جهت تعیین اینکه آیا کاهش ادم ایجاد شده توسط مرفین، توسط پپتیدهای اپیوئیدی درون زا میانجی گری می شود یا نه، نالوکسان هیدروکلراید (سیگما) با دوز ۱۰ mg/kg به شیوه درون صفاقی و ۱۵۰ دقیقه بعد از تزریق کاراژینان تزریق شد. بررسی میزان پروتئین BDNF سرم خون در گروههای مورد آزمایش به کمک روش الایزا انجام گرفت. خون گیری از حیوانات در زمان های مشاهده حداکثر اثر ضد التهابی یا مشاهده حداکثر اثر التهاب زایی به روش قطع گردن انجام گرفت. پس از جمع آوری خون و لخته شدن آن به مدت ۲۰ دقیقه در ۲۵۰۰ دور سانتریفوژ گردید و سرم خون در لوله های پلی پروپیلن جمع آوری و در دمای ۲۰– درجه سانتی گراد جهت اندازه گیری BDNF نگهداری شد. سطوح سرمی BDNF با استفاده از کیت اختصاصی و به روش الایزا مطابق دستورالعمل‌های ذکر شده از طرف کارخانه سازنده (R &D co. UK) اندازه گیری شد. بررسی آماری نتایج به دست آمده با استفاده از برنامه آماری این استد۳ صورت گرفت. تحلیل آماری داده های بدست آمده با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه صورت گرفت و در مواردی که اختلاف بین گروه ها معنی دار بود از تست مقایسه بین گروهها استفاده شد. این تست تعقیبی، تمامی گروههای آزمایشی را به صورت جفت با هم مقایسه نموده و اختلافات معنی دار وجود بین گروههای مختلف را باهم و با گروه کنترل نشان می دهد. داده ها به صورت میانگین بعلاوه و منهای میانگین خطای استاندارد بیان گردیده و در تمام مقایسات سطح معنی دار بودن اختلاف ۰/۰۵ >P در نظر گرفته شده است. اصول اخلاقی توصیه شده توسط انجمن بین المللی درد برای کار بر روی حیوان در این مطالعه مورد ملاحظه قرار گرفت.

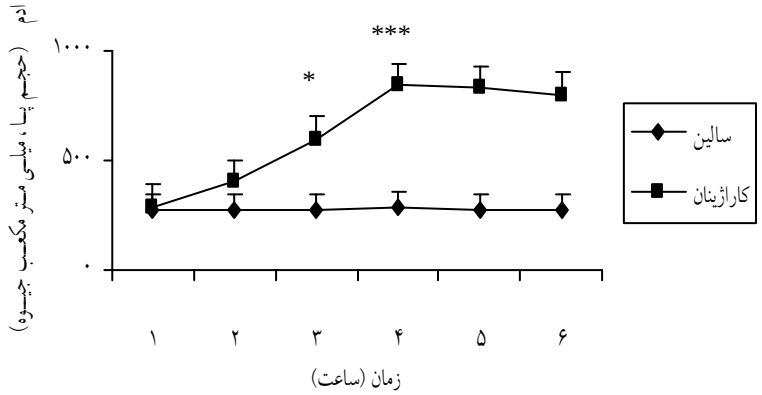
یافته ها

در آزمایش اول تاثیر کاراژینان در ایجاد التهاب و اثر ضد التهابی مرفین مورد سنجش قرار گرفت. در این آزمایش اثر تزریق ipl کاراژینان لامبدا به میزان ۰/۰۵ میلی لیتر از محلول ۳٪ سبب ایجاد ادم در پای راست حیوان گردید. اثر التهاب زایی کاراژینان ۳۰ دقیقه پس از تزریق ظاهر و در ساعات ۴ به حداکثر خود رسید (نمودار ۱). مطابق نمودار ۱، میزان التهاب در ساعت های ۳ و ۴

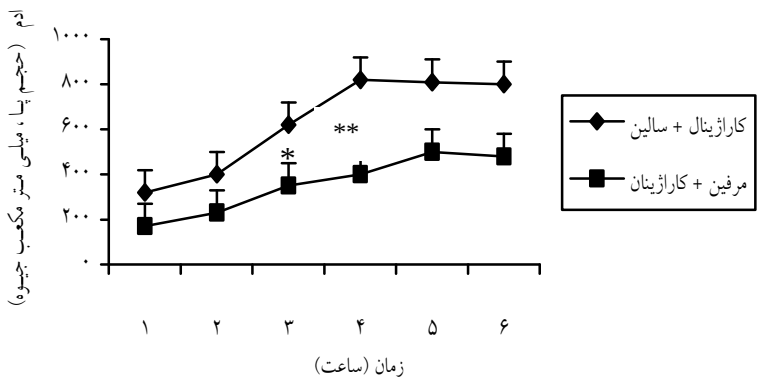
نسبت به گروه کنترل افزایش معنی دار نشان می دهد. مقایسه گروه کنترل یا گروه دریافت کننده سالین در ساعت ۳ (۴,۱۸±۳۰۱) با گروه دریافت کننده کاراژینان در همان ساعت (۲,۱۱ ±۸۵۰/۵) بیانگر اختلاف معنی دار (در سطح $P< ۰/۰۵$) می باشد. از طرفی در ساعت ۴ میزان ادم در گروه دریافت کننده کاراژینان (۸۵۳±۳/۶۶) در مقایسه با گروه سالین (۵/۰۵±۲۸۶) به حداکثر خود رسید ($P< ۰/۰۰۱$).

در نمودار۲، پیش تیمار مرفین با دوز mg/kg ۷ به روش درون صفاقی یا i.p سبب ایجاد کاهش معنی دار در ادم ایجاد شده توسط کاراژینان در زمان های ۳ و ۴ در مقایسه با گروه کنترل گردید، به طوری که مقایسه گروه دریافت کننده مرفین + کاراژینان در ساعت ۳، (۲۳۰±۳/۰۹) با گروه دریافت کننده سالین + کاراژینان (۵۸۳±۲/۲۵) بیانگر اختلاف معنی دار در سطح ($P< ۰/۰۵$) می باشد. همچنین در ساعت ۴ نیز اختلاف معنی داری بین گروه دریافت کننده مرفین + کاراژینان (۴/۱ ±۳۸۰) با گروه دریافت کننده سالین + کاراژینان (۳/۵۰±۸۲۰ در سطح (P<0.01) وجود دارد. در نمودار ۳، به منظور تایید اثر اپیوئیدهای درون زا در کاهش ادم، نالوکسان هیدروکلراید به شیوه درون صفاقی با دوز mg/kg i.p ۱۰ حدود ۱۵۰ دقیقه بعد از تزریق کاراژینان، تزریق شد و نتایج نشان داد که نالوکسان سبب توسعه التهاب ایجاد شده توسط کاراژینان طی ۲و ۳ ساعت بعد از تزریق کاراژینان گردید، در واقع مقایسه گروه دریافت کننده کاراژینان+ مرفین (۰,۹۱±۲۲۰) با گروه دریافت کننده نالوکسان + مرفین + کاراژینان (۱/۸۳±۷۰۲) در ساعت ۲ بیان گر وجود اختلاف معنی دار (در سطح $P< ۰/۰۵$) می باشد. همچنین در ساعت ۳ نیز اختلاف معنی داری در سطح ($P< ۰/۰۱$) بین گروه دریافت کننده کاراژینان + مرفین (۱/۷۴±۳۸۰) با گروه دریافت کننده نالوکسان + مرفین + کاراژینان (۲/۱۱ ±۸۷۰) وجود دارد.

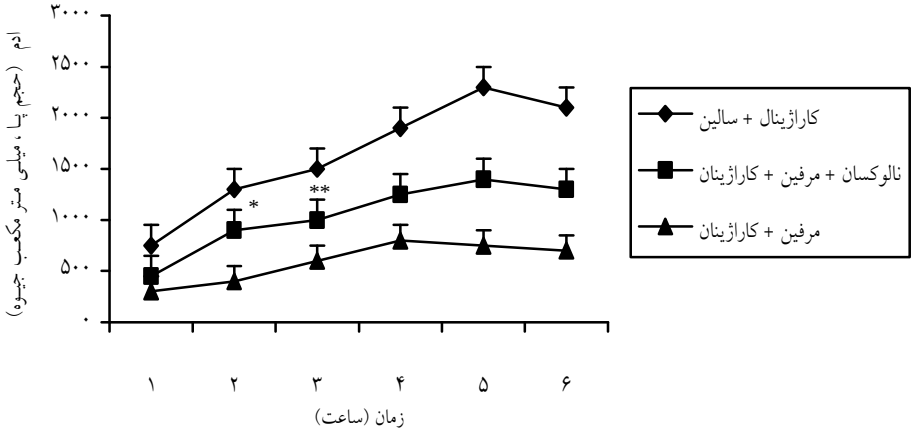
در نمودار چهارم، تغییرات سطوح پروتئین BDNF در تمامی گروههای مورد آزمایش به روش الایزا تعیین گردید. تحلیل آماری داده ها نشان می دهد که فقط در گروه دریافت کننده کاراژینان میزان پروتئین BDNF در سرم (۸۷۶/۶ ±۶۴۸۰) نسبت به گروه کنترل (۷۸۵ ±۹۲۶۸) افزایش معنی داری نشان می دهد ($P< ۰/۰۵$). از طرفی پیش تیمار مرفین در گروه دریافت کننده کاراژینان به طور معنی داری سطوح BDNF سرم را تغییر نداد.



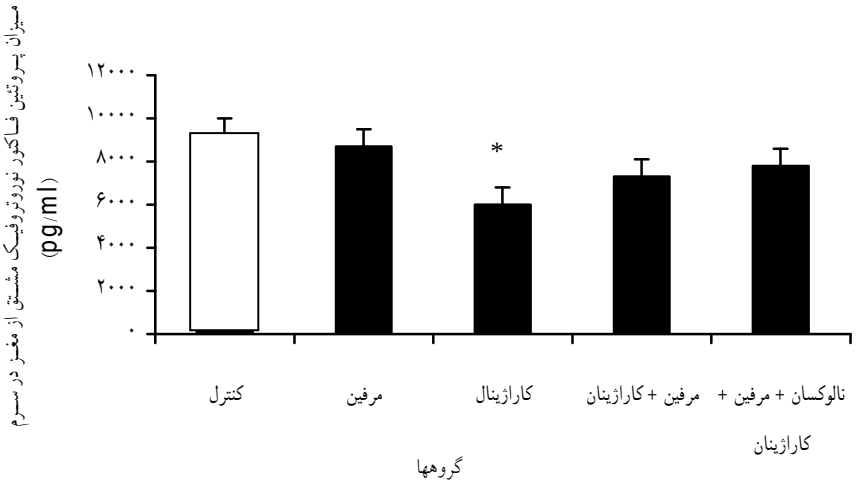
نمودار ۱: تاثیر کاراژینان در ایجاد التهاب . هر نقطه بیان گر میانگین ± میانگین خطای استاندارد است.
* ($P< ۰/۰۵$) و **** ($P< ۰/۰۰۱$) نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروه دریافت کننده سالین و گروه دریافت کننده کاراژینان است.



نمودار ۲. اثر پیش درمان با دوز ضد التهاب مرفین بر ادم ناشی از تزریق کاراژینان.
* ($P< ۰/۰۵$) و ** ($P< ۰/۰۱$) به ترتیب بیانگر کاهش معنی دار ادم در ساعات ۳ و ۴ می باشند.



نمودار ۳. تاثیر نالوکسان هیدروکلراید به عنوان آنتاگونیست مرفین بر توسعه التهاب ایجاد شده توسط کاراژینان. * ($P< ۰/۰۵$) و ** ($P< ۰/۰۱$) به ترتیب بیانگر کاهش معنی دار ادم در ساعات ۲ و ۳ می باشند.



نمودار ۴. تغییرات میزان پروتئین BDNF سرم طی التهاب ایجاد شده توسط کاراژینان و رفع التهاب توسط مرفین. میزان پروتئین BDNF در گروه دریافت کننده کاراژینان تفاوت معنی دار * ($P< ۰/۰۵$) نشان می دهد.

بحث

در تحقیق حاضر، تغییرات سطوحBDNF سرم خون طی التهاب ایجاد شده توسط کاراژینان و نیز در طی رفع التهاب توسط مرفین مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه، تزریق کاراژینان به کف پای (راست) جانوران سبب بروز التهاب و افزایش حجم پای رت گردید و این اثر در حدود ساعات ۴-۳ به ماکزیمم رسیده و از حدود ساعت ۵ و ۶ رو به کاهش گذاشت. پیش تیمار رت ها با تزریق درون صفاقی مرفین حدود ۳۰ دقیقه قبل از کاراژینان میزان ادم ناشی از کاراژینان را به طور معنی داری کاهش داد که این نتایج با یافته های محققین قبلی (۱۷) مطابقت دارد. مشخص شده است که التهاب ایجاد شده توسط کاراژینان یک پاسخ وابسته به نوتروفیل های گردش خون بوده و با تورم، هیپرترمی و نشت مایعات عروقی همراه است (۲۲و ۲۱). از طرفی مرفین علاوه بر اثر ضددردی دارای اثرات ضد التهابی نیز می باشد. تاثیر مرفین روی درد و سیستم ایمنی به اثبات رسیده است (۲۳). مرفین با فعال کردن محور هیپوتالاموس – هیپوفیز غده آدرنال (فوق کلیه) اثرات ضد درد، اثرات وابستگی و نقش تعدیلی خود را بر روی سیستم ایمنی به اثبات می رساند (۲۴). مشخص شده است که مرفین سبب کاهش هیپوترمی و کاهش نشت مایعات عروقی ناشی از کاراژینان می گردد (۴). مرفین با توقف آزادسازی نوروپپتیدهای مسبب التهاب، میزان ادم را کاهش می دهد (۲۵).

از طرفی مشخص شده مرفین قادر به تولید سیتوکاین‌ها می‌باشد. به طوری که اینترلوکین I می تواند واسطه اثرات ضد

التهابی مرفین در مدل التهاب ناشی از کاراژینان باشد (۱۷). در این مطالعه برای بررسی اثرات اوپیوئیدهای پپتیدی درون زا بر التهاب ناشی از کاراژینان از تزریق درون صفاقی نالوکسان استفاده شد. تجویز نالوکسان در دوز mg/kg ۱۰ و حدود ۱۵۰ دقیقه بعد از تزریق کاراژینان موجب افزایش التهاب ناشی از کاراژینان در دو ساعت اول آزمایش گردید. لذا اوپیوئیدهای پپتیدی درون زا سیستمیک در کنترل میزان التهاب نقش دارند. نالوکسان بعد از گذشت ۲ ساعت اثری بر التهاب ناشی از کاراژینان نداشت. بنابراین شاید سایر عوامل دخیل در پروسه های التهابی روند التهاب توسط کاراژینان را کنترل می نمایند. در این مطالعه، سنجش سطح سرمی BDNF در گروه های مختلف نشان دهنده افزایش معنی دار سطح سرمی BDNF در گروه دریافت کننده کاراژینان به تنهایی است. بنابراین احتمالا اثرات التهابی کاراژینان از طریق افزایش سطح سرمی BDNF واسطه گری می شود. از طرفی پیش تیمار مرفین نتوانست سطوح BDNF سرم را در گروه دریافت کننده کاراژینان تغییر دهد. لذا اثرات ضد التهابی مرفین ارتباطی با این نوروپپتید ندارد و همانگونه که قبلا نیز اشاره شد اثرات ضد التهابی مرفین بیشتر با تغییر سیتوکاین ها سروکار دارد.

به طور کلی مشخص شده التهاب محیطی سبب افزایش بیان پروتئین BDNF در سلولهای عقده ریشه پشتی نخاع می گردد. همچنین در زمان التهاب، گیرنده تیروزین کنیاز BDNF (trkB) نیز دچار تنظیم افزایشی می گردد (۲۲). در دردهای مزمن نیز BDNF سبب ایجاد شکل پذیری در نورون های شاخ پشتی نخاع می گردد (۲۶). همچنین کاهش بیان پروتئین BDNF یا گیرنده آن سبب مهار هیپرآلژزی القاء شده توسط کاراژینان می گردد (۲۷). بنابراین یافته های ما برای اولین بار نشان داد که طی التهاب ایجاد شده توسط کاراژینان سطوحBDNF سرم خون تغییر می نماید. در واقع پیشنهاد شده که افزایش BDNF در زمان التهاب ممکن است اثر حفاظتی داشته و خود به عنوان یک فاکتور ضد التهابی و حفاظت کننده سلولها وارد عمل شود (۲۸). به هر حال جهت تایید این موضوع نیاز به تحقیقات بیشتری است.

نتیجه گیری

به طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که سطوح BDNF سرم خون طی التهاب ناشی از کاراژینان تغییر می نماید ولی اثر ضد التهابی مرفین ارتباطی به تغییرات سطوح BDNF سرم خون ندارد.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با پشتیبانی مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در قالب طرح تحقیقاتی انجام شده است که بدین وسیله مراتب تشکر و امتنان ابراز می گردد.

References

1. Bracci-Laudiero L, Aloe L, Levi-Montalcini R. Increased levels of NGF in sera of systemic lupus erythematous patients. *Neuroreport* 1993; **4**(5): 563-565.
2. Fantini F, Magnoni C, Bracci-Laudiero L, Pincelli CTF. Nerve growth factor is increased in psoriatic skin. *J Invest Dermatol* 1995; **105**: 854-855.
3. Araksinen MS, Saarma M. The GDNF family: signaling, biological function and therapeutic value. *Nat. Rev. Neurosci* 2002; **3**: 383–394.
4. Rost B, Hanf G, Ohnemus U, Otto-Knapp R: Monocytes of allergic and non-allergics produce, store and release the neurotrophins NGF, BDNF and NT-3. *Regulatory Pep* 2004; **124**(1-3): 19-25.
5. Cho HJ, Kim SY, Park MJ. Expression of mRNA for brain-derived neurotrophic factor in the dorsal root ganglion following peripheral inflammation. *Brain Res* 1997; **749**(2): 358- 362.
6. Ha SO, Kim JK, Hong HS, Kim DS, Cho HJ. Expression of brain-derived neurotrophic factor in rat dorsal root ganglia, spinal cord and gracile nuclei in experimental models of neuropathic pain. *Neuroscience* 2001; **107**(2): 301-309.
7. Michael GJ, Averill S, Shortland PJ, Yan Q, Priestley JV. Axotomy results in major changes in BDNF expression by dorsal root gangelion cells. BDNF expression in large trkB and trkC cells, in pericellular baskets, and in projection to deep dorsal horn and dorsal column nuclei. *Eur J Neurosci* 1999; **11**(10): 3539-3551.
8. Thomson SW, Bennett DLH, Kerr BJ, Bradbury EJ. Brain derived neurotrophic factor is an endogenous modulator of nociceptive responses in the spinal cord. *Natl Acad Sci USA* 1999; **96**(14): 7714-7718.
9. Pezet S, Malcangio M, McMahon SB. BDNF: a neuromodulator in nociceptive pathways? *Brain Res Rev* 2002; **40**(1-3): 240- 249.
10. Kerr BJ, Bradbury EJ, Bennett DLH, Trivedi PM, Dassan P. Brain- derived neurotrophic factor modulates nociceptive sensory inputs and NMDA-evoked responses in the rat spinal cord. *J Neurosci* 1999; **19**(12): 5138- 5148.
11. Yamamoto H, Gurney ME. Human platelets contain brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 1990; **10**(11): 3469-3478.

12. Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T. Activated human T cells, B cells and monocytes produce brain- derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions. a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med* 1999; **189**(5): 865-870.
13. Onda A, Murata Y, Rydevik B, Larsson K: Immunoreactivity of brain-derived neurotrophic factor in rat dorsal root ganglion and spinal cord dorsal horn following exposure to herniated nucleus pulposus. *Neyrosci Lett* 2003; **352**(1): 49-52.
14. Anne-Laure F, Fabrice L, Marie-Claude L, Ahmed B, Jean-Louis P, Elisabeth Vidal, Marie-Odile J. Role of Endogenous Brain-Derived Neurotrophic Factor and Sortilin in B cell Survival. *The Journal of Immunology* 2008; **181**(5): 3027-3038.
15. Radka SF, Holst PA, Fritsche M, Altar CA. Presence of brain-derived neurotrophic factor in brain and human and rat but not mouse serum detected by a sensitive and specific immunoassay**.** *Brain Res* 1996; **709**(1): 122-301.
16. Lee BH, Kim YK. Reduced platelet BDNF level in patients with major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009**; 33**(5): 849-853.
17. Alebouyeh M, Pourpak Z, Ahmadiani A. Increase in serum level of interleukin-1 alpha mediates morphine anti-inflammatory effect in carrageenan-induced paw edema in mice. *Cytokine* 2002; **19**(2): 102-105.
18. Joris J, Costello A, Dubner R, Hargreaves KM. Opiates suppress carrageenan induced edema and hyperthermia at doses that inhibit hyperalgesia. *Pain* 1990; **43**(1): 95-103.
19. Szabo I, Rojavin M, Bussiere J L, Eisenestein TK, Adler M W, Rogers TJ. Suppression of peritoneal macrophage phagocytosis of candida albicans by opioids. *J Pharmacol Eep Ther* 1993; **297**(2): 703-706.
20. Fereidoni M, Ahmadiani A, Semnanian S, Javan M. An accurate and simple method for measurement of paw edema. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2000; **43**(1): 1-14.
21. Leung BP, Culshaw S, Gracie JA, Hunter D: A role for IL-18 in neutrophil activation. *J Immunology* 2001; **167**: 2879-2886.
22. Tsuji RF, Hoshino K, Noro Y, Tsuji NM, Kurokawa R. Suppression of allergic reaction by λ- carrageenan: toll-like receptor 4/MyD88-dependent and-independent modulation of immunity. *Clin Exp Allergy* 2003; **33**(2): 249-258.
23. Vallejo R, Leon- Casasola O, Benyamin R. Opioid therapy and immunosuppression: a review. *Am J Ther* 2004; **11**(5): 354-365.
24. Kiefer F, Wiedemann K. Neuroindocrine pathways of addictive behaviour. *Addict Biol* 2004; **9**(3-4): 205-212.
25. Yaksh TL. Substance P release from knee joint afferent terminals: modulation by opioids. *Brain Res* 1988; **458**(2): 319–324.
26. Ulmann L, Hatcher JP, Hughes JP, Chaumont S, Green PJ, Conquet F. Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain. *J Neurosci* 2008; **28**(44): 11263-11268.
27. Groth R, Aanonsen L. Spinal brain-derived neurotrophic factor produces hyperalgesia in normal mice while antisense directed against either BDNF or trkB, prevent inflammation induced hyperalgesia. *Pain* 2002; **100**(1-2): 171-181.
28. Koichi O, Koichi N. BDNF in sensory neurons and chronic pain. *Neurosci Res* 2006; **55**(1): 1-10.