دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست- پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال هفدهم، شماره ۶، صفحه ۱۱۸۷– ۱۱۷۶ (بهمن و اسفند ۱۳۹۳)
ISMJ 2015; 17(6): 1176-1187

بررسی ارتباط سلولی– مولکولی میزان سرمی اینترلوکین ۱۰ با تغییرات هیپرآلژزی در موش‌های صحرایی نر بالغ آرتریتی شده به وسیله ادجوانت

زینب اختری [۱]،جلال زرین‌قلم [۲*]، اکرم عیدی [۱]، سیدعلی حائری‌روحانی [۱]،
هما مناهجی [۲]، الهه تکیه [۲]

[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی
[۲] گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

دریافت مقاله: ۹۱/۱۰/۱۴– پذیرش مقاله: ۹۲/۴/۱۶

چکیده

زمینه: با توجه به نقش ضدالتهابی اینترلوکین۱۰ که به‌عنوان یک سیگنال مهاری کلیدی طی روند القا التهاب عمل می‌کند، همچنین تغییرات هیپرآلژزی و ادم در مراحل مختلف التهاب و افزایش بیان گیرنده‌های اوپیوئیدی "مو" طی التهاب آرتریتی، محققین در این مطالعه به بررسی ارتباط سلولی- مولکولی میزان سرمی سایتوکاین اینترلوکین۱۰ با تغییرات هیپرآلژزی در مدل التهابی آرتریتی ناشی از ادجوانت در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار پرداخته‌اند.

مواد و روش‌ها: التهاب به‌وسیله تزریق (complete freund's adjuvant) CFA به کف پای موش‌ها، القا شد و علائم التهابی (هایپرآلژریا و ادم) در روزهای ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ ارزیابی شد. آنتی‌بادی اینترلوکین ۱۰ به صورت روزانه به‌مدت ۲۱ روز به گروه‌های مختلف مورد مطالعه تزریق گردید. بیان گیرنده‌های مو اوپیوئیدی به‌وسیله تکنیک وسترن‌بلات در روزهای صفر، ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ مطالعه شد. آنالیز نتایج مرتبط با متغیرها توسط نرم افزار آماری SPSS ویرایش ۱۹ با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تزریق آنتی‌بادی اینترلوکین ۱۰ در گروه آرتریتی موجب افزایش معنی‌دار ادم و هیپرآلژزی طی ۲۱ روز مطالعه شد. تزریق آنتی‌بادی اینترلوکین ۱۰ تغییر معنی‌داری در بیان گیرنده‌های مو اوپیوئیدی نخاعی در رت‌های آرتریتی را نسبت به گروه کنترل ایجاد نکرد.

نتیجه‌گیری: مطالعات اخیر نشان داد که استفاده از آنتی‌بادی اینترلوکین ۱۰ موجب القاء هیپرآلژزی و ادم طی مراحل مختلف التهاب القاء شده با CFA می‌گردد. همچنین این یافته‌ها پیشنهاد می‌کنند که افزایش بیان گیرنده‌های مو اوپیوئیدی نخاعی در فاز مزمن التهاب احتمالاً از طریق تأثیر مستقیم اینترلوکین ۱۰ میانجی‌گری نمی‌شود.

واژگان کلیدی: التهاب، هیپرآلژزی، ادم، ،CFA، اینترلوکین ۱۰، گیرنده‌های مو

* تهران، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

Email: jzaringhalam@yahoo.com

مقدمه

آرتریت روماتوئید بیماری التهابی سیستمیک و مزمن با علت ناشناخته است. این بیماری التهابی مخرب، با هیپرتروفی مایع سینوویال و نفوذ سلول‌های التهابی در غضروف و فرسایش پیشرونده استخوان و غضروف با دکلسیفیکاسیون استخوان به‌صورت موضعی همراه می‌باشد و سیمای سیستمیک آن شامل یک پاسخ فاز حاد مشخص همراه با افزایش مقادیر برخی آنتی‌بادی‌هاست (۱).

این بیماری از طریق درگیر کردن سلول‌های T، روند خود را تداوم می‌بخشد. سطوح بالای سایتوکاین‌های IL-۱، TNFα(Tumor Necrosis Factor α) و فاکتورهای مهاجرت ماکروفاژها طی التهاب در بیماران آرتریت روماتوئید یافت شده‌اند. آرتریت روماتوئید روند متغیری دارد که اغلب با دوره‌هایی از عود و گاهی با کاهش علائم همراه است (۲ و ۳).

القاء التهاب توسط تزریق کف پایی CFA(complete freund's adjuvant) یکی از روش‌های رایج ۳۰ ساله جهت بررسی تغییرات سلولی، ملکولی و رفتاری طی بیماری‌های التهابی حاد و مزمن مانند آرتریت روماتویید در انسان می‌باشد و به‌طور گسترده به‌عنوان مدل تجربی استفاده می‌شود. این مدل فازهای مختلف آرتریتی را در انسان نشان می‌دهد که در ارزیابی روش‌های درمانی مختلف نیز حائز اهمیت می‌باشد (۴). 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 (۵ و ۶).

مطالعات نشان می‌دهد که مدل التهابی القا شده با CFA از نظر پاسخ‌های رفتاری یک مدل دو فازی است که در فاز اول با افزایش هیپرآلژزی همراه است که به سبب حضور سایتوکین‌های التهابی نظیر IL-۱، TNF-α، IL-۶ می‌باشد، در حالی‌که در فاز دوم، علی‌رغم بالا بودن این سایتوکاین‌ها هیپرآلژزی به‌طور چشمگیری در هفته سوم کاهش یافته است (۷).

شواهدی وجود دارد که پیش تیمار با آگونیست گیرنده اوپیوئیدی مو (μ)، هیپرآلژزی القا شده با آسیب حرارتی را طی فاز آرتریتی کاهش داده است (۸).

دانشمندان نشان داده‌اند که التهاب آرتریتی می‌تواند شماری از گیرنده‌های مو اوپیوئیدی را در هیپوتالاموس و در طناب نخاعی افزایش دهد (۹). به‌نظر می‌رسد که گیرنده‌های مو اوپیوئیدی یکی از میانجی کننده‌های مهم اثرات آنالژزیک اوپیوئیدها باشند. علاوه‌بر این، گیرنده‌های مو اوپیوئیدی در التهاب تنظیم افزایشی می‌شوند که ممکن است در بیان اثرات ضددردی اوپیوئیدهای اندوژنز نقش داشته باشند (۱۰).

مطالعات نشان داده‌اند که سایتوکاین‌ها، پپتیدهای اوپیوئیدی را از سلول‌های ایمنی بافت ملتهب، آزاد می‌سازند که این موضوع سبب اثرات ضددردی بر پایانه‌های عصبی حسی می‌شود (۱۱). از سوی دیگر اینترلوکین۱۰ (IL-۱۰) یکی از عوامل مسیر ایمنی (T helper type2) می‌باشد و به‌عنوان سایتوکاینی با عملکردهای التهابی و ضدالتهابی در نظر گرفته شده است (۱۲) که از طریق مهار تولید TNFα و IL-۱۲ و اینترفرون گاما (IFNγ) عمل می‌نماید تا علائم التهابی را محدود کند. وجود موش‌هایی با نقص اینترلوکین۱۰ که به‌طور خود به خودی مبتلا به

بیماری التهابی مزمن روده‌ای شده‌اند دلیلی بر نقش ضدالتهابی این اینترلوکین می‌باشد (۱۳).

مطالعات نشان داده است که اینترلوکین ۱۰ در پاسخ به آنتی ژن، تکثیر و تولید سایتوکاین را از سلول‌های T مهار می‌نماید (۱۴).

دانشمندان پیشنهاد می‌کنند که تولید اینترلوکین ۱۰، ۱۶-۱۲ ساعت بعد از فعالیت مونوسیت‌ها طی التهاب القا می‌شود و به‌عنوان مهار کننده‌ای برای بیان ژن PGS۲، GM-CSF، IL-۱β، IL-۱۲، TNF-α و PLA۲ عمل می‌نماید. اینترلوکین ۱۰ اثرات خود را بر این واسطه‌ها از طریق کاهش بیان mRNA آن‌ها و مهار فعالیت فاکتورهای رونویسی آن‌ها اعمال می‌نماید (۱۶). اینترلوکین ۱۰ یک سیگنال مهاری کلیدی از پاسخ‌های ایمنی است که تولید سایتوکاین‌های پاتوژنیک مانند TNF-α را به‌طور بالقوه تنظیم می‌نماید. اینترلوکین ۱۰ با هدف‌گیری mRNA TNF-α اثرات مهاری خود را بر ترجمه می‌گذارد (۱۷). بنابراین با توجه به تغییرات هیپرآلژزی و ادم در مراحل مختلف التهاب ناشی از CFA، همچنین افزایش بیان گیرنده‌های مو اوپیوئیدی نخاعی طی التهاب آرتریتی و نقش ضدالتهابی IL-۱۰ طی التهاب، تولید و ترشح سایر سایتوکاین‌های التهابی و ضدالتهابی در مراحل مختلف التهاب و هدف قرار دادن برخی از این سایتوکاین‌ها در درمان علایم التهابی در بیماران آرتریت روماتوئید، بنابراین محققین طی این مطالعه ارتباط سلولی- مولکولی میزان سرمی اینترلوکین ۱۰ با تغییرات هیپرآلژزی در موش‌های صحرایی نر بالغ آرتریتی شده به‌وسیله ادجوانت را مورد بررسی قرار می‌دهند.

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی

در این آزمایش از رت‌های نر نژاد ویستار با میانگین وزنی ۱۸۰ تا۲۰۰ گرم استفاده شد. رت‌ها در قفس‌های پلی‌پروپیلن در شرایط استاندارد (۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۷۰-۶۰ درصد و سیکل زمانی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) نگهداری شدند. غذا و آب کافی در اختیار همه حیوانات قرار گرفت. روش استفاده از حیوانات آزمایشگاهی بر اساس قوانین کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی بوده و ایجاد درد در حیوانات آزمایشگاهی نیز طبق استانداردهای زیمرمن (Zimmerman) صورت گرفت (۱۸).

طراحی مطالعه

رت‌ها به‌صورت تصادفی به ۳ گروه آزمایشی متفاوت شامل گروه AA (Adjuvant Arthritis) که تنها CFA را دریافت نمودند، گروه AA+PBS که PBS را به‌عنوان Vehicleبه همراه CFA دریافت کردند و گروه AA+IL Anti-۱۰ که CFA را به‌همراه آنتی‌بادی اینترلوکین۱۰ دریافت نمودند تقسیم شدند. هر گروه نیز به نوبه خود به ۴ زیر گروه برای بررسی روزهای ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ تقسیم شدند. تعداد رت‌ها در هر گروه ۶ سر بود. التهاب به‌وسیله‌ی تزریق زیر پوستی CFA (تحت بیهوشی سطحی) در پای راست حیوانات در روز صفر ایجاد شد. آنتی‌بادی اینترلوکین ۱۰ از روز اول بعد از تزریق CFA به‌مدت ۲۱ روز به‌صورت داخل صفاقی به‌صورت روزانه تزریق شد (۲۲). بررسی‌های مولکولی، رفتاری، سنجش حجم پا و سطح سرمی اینترلوکین ۱۰ در روزهای صفر، ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ انجام شد. حیوانات با متوکسی فلوران بیهوش شده و با استفاده از گردن زدن

کشته شده، نخاع آن‌ها به‌طور کامل خارج گردید و ابتدا در نیتروژن مایع، سپس در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد فریز شدند و میزان بیان گیرنده‌های مو اوپیوئیدی نخاعی به‌روش وسترن بلات مورد سنجش قرار گرفت.

ایجاد التهاب ناشی از CFA

التهاب به‌وسیله‌ی تزریق زیر جلدی ۱۰۰ میکرولیتر CFA (مایکوباکتریم توبرکلوزیس تضعیف شده) حل شده در روغن معدنی استریل (USA، MO، St Louis، Sigma ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به کف پای راست حیوانات در روز صفر ایجاد شد. ادم یک طرفه در روز اول بعد از تزریق CFA به کف پا، ایجاد می‌گردد و این شرایط طی ۲۱ روز بعد از تزریق نیز ادامه پیدا می‌کند. لازم به ذکر است که در گروه کنترل صرفاً روغن معدنی استریل با همان حجم و روش تزریق شد.

سنجش ادم پا

برای تأیید سنجش تزریق صحیح CFA، حجم هر پا قبل و بعد از تزریق در طی زمان‌های متفاوت مورد سنجش قرار گرفت. سنجش حجم پا به‌وسیله‌ی جابه‌جایی یک محلول الکترولیتی در پلتیسمومتر (Italy، Comerio VA، Ugo Basile، مدل ۱۷۱۴۱) انجام شد. مقدار ادم به‌وسیله سنجش تفاوت حجم پا بین روز صفر و زمان‌های مختلف محاسبه شد و حجم اندازه‌گیری شده نسبت به روز صفر گزارش گردید.

سنجش هیپرآلژزی حرارتی

پس کشیدن پا (PWL: paw withdrawal latency) در اثر حرارت به‌وسیله‌ی تست‌های کف پایی (Italy، Ugo Basile ،Verse) در گروه‌های کنترل و آزمایش انجام شد. رت‌ها در اتاقک‌های پلکسی گلاس به‌مدت ۱۵-۱۰ دقیق ه قبل از آزمایش قرار داده شدند تا به محیط آزمایش عادت کنند. عقب کشیدن پا به‌طور اتوماتیک به‌وسیله‌ی تایمر دیجیتال که به یک منبع حرارتی متصل بود ثبت شد. در این روش بخش میانی کف پای حیوان در معرض اشعه قرار گرفته و زمان تأخیر در عقب کشیدن پا (paw withdrawal latency) ثبت گردید. PWL سه بار برای هر پا در یک فاصله زمانی ۱۰- ۵ دقیقه سنجیده و مقدار میانگین محاسبه شد. Cut off در نظر گرفته شده در این آزمایش ۲۰ ثانیه بود. مقدار محاسبه شده پای تزریق شده، از مقدار محاسبه شده مربوط به پای دیگر کم گردید و مقدار به‌دست آمده در صورت منفی بودن نشان دهنده هایپرآلژزی در پای مورد نظر بود (۱۹).

سنجش سطوح اینترلوکین ۱۰ سرمی در نمونه‌های خونی

نمونه خونی از عروق رتروارتیال گوشه چشم رت‌هایی که با ایزوفلوران بیهوش شده بودند، به‌وسیله‌ی لوله مویین هپارینه تهیه شد. نمونه‌های خونی سانتریفیوژ شده و سرم حاصل در دمای۷۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. سطوح سرمی اینترلوکین ۱۰ به‌وسیله کیت Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) استاندارد رت (Bender Med System ،Uk) از طریق واکنش متقابل آن با اینترلوکین ۱۰ سرم رت‌ها بر اساس دستورالعمل کیت سنجیده شد.

تجویز آنتی‌بادی اینترلوکین ۱۰

برای سنجش نقش اینترلوکین ۱۰ در ایجاد علائم AA، رت‌ها با آنتی‌بادی اینترلوکین ۱۰به‌منظور کاهش سطوح سرمی اینترلوکین ۱۰ تیمار شدند. آنتی‌بادی اینترلوکین ۱۰ توسط سیستم‌های R&D(Abcam/Uk) تهیه شد. برخی از مطالعات، فعالیت مؤثر این آنتی‌بادی نوترکیب را

در رت نشان داده‌اند (۲۰)، با توجه به مطالعه خادارو (Khadaroo) و همکاران و طبق دستورالعمل کارخانه تولید کننده (catalogue number ab۹۹۶۹)، در این مطالعه دوز خنثی‌کننده (ND۵۰) برای آنتی‌بادی اینترلوکین anti-rat۱۰ توأم با غلظت ۰/۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر در هر رت ۰/۸–۰/۴۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد (۲۰). آنتی‌بادی تخلیص شده‌ی اینترلوکین ۱۰ در محلول PBS (phosphate-buffered saline) برای تزریق داخل صفاقی (i.p.) رقیق شد و گروه شاهد PBS را به‌عنوان vehicle دریافت کردند.

سنجش بیان گیرنده‌های مو (mOR) اوپیوئیدی نخاعی به‌وسیله‌ی Western blotting

بعد از تست‌های رفتاری، برای سنجش میزان بیان گیرنده‌های مو اوپیوئیدی در نخاع از روش وسترن بلات استفاده شد (۲۱). رت‌ها با استفاده از ایزوفلوران بیهوش و نخاع آن‌ها به سرعت خارج و در یخ قرار گرفت. سپس در بافر استخراج هموژنیزه و نمونه‌ها با دور ۱۰۰۰۰rpm در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی برای سنجش غلظت پروتئین جدا شد. مقدار مساوی از پروتئین‌ها (۶۰µg) برای ترکیب شدن با loading buffer آماده شد. نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه جوشانده و به‌مقدار مساوی (۱۲ µl) به‌روش الکتروفورز به‌مدت ۶۰ دقیقه با ولتاژ ۱۲۰Vدر ژل پلی‌اکریل آمید از هم جدا شدند. پروتئین‌ها با استفاده از miniprotean II (Bio-Rad)، در ولتاژ ۱۰۰V به‌مدت ۸۵ دقیقه از روی ژل بروی کاغذ PVDF منتقل شدند. سایت‌های غیراختصاصی موجود بر کاغذ به‌وسیله‌ی انکوباسیون با بافر بلاکینگ به‌مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۲۴ درجه پوشانده شد. سپس دوباره کاغذها به‌مدت یک ساعت در دمای ۲۴ درجه با آنتی‌بادی اولیه‌ی محلول در بافر بلاکینگ شستشو داده شد و سپس با آنتی‌بادی ثانویه محلول در بلاکینگ به‌مدت یک ساعت در دمای ۲۴ درجه انکوبه شدند. کاغذها ۳ بار با بافر بلاکینگ شسته شدند. فعالیت immunoreactivity پروتئین‌ها با استفاده از (Amersham، ECL، chemiluminescencedetection system) تشخیص داده شد. کاغذها با محلول stripping به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه و با آنتی‌بادی اولیه (Cell Signaling، ۵۰۰۰: ۱) β -actin به‌عنوان یک نمونه کنترل انکوبه شدند. تراکم باندها به‌وسیله‌ی نرم‌افزار سنجش تراکم NIH Image(۱/۶۰) سنجیده شد و به‌صورت نسبت تراکم گیرنده‌های مو اوپیوئیدی به تراکم β-actin بیان شد.

آنالیزهای آماری

مقایسه‌ی داخل گروهی ادم و هایپرآلژزیای حرارتی اینترلوکین ۱۰ با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه One way ANOVA(Post hoc Tukey's) صورت پذیرفت. نرم‌افزار مورد استفاده SPSS (USA،Il ،Chicago،SPSS Inc) ویرایش ۱۹ بود، رسم نمودارها از طریق Excel انجام گردید. در این مطالعه P<۰/۰۵ معنی‌دار تلقی شد.

یافته‌ها

تغییرات حجم پا در طی مراحل مختلف AA

تزریق CFA در کف پای راست موش‌ها در روز اول موجب القاء التهاب و ادم در همان پا شد که این افزایش تا روز ۲۱ بعد از تزریق نیز ادامه داشت. حجم پا در روزهای ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ بعد از تزریق CFA در مقایسه با روز صفر افزایش مشخص و معنی‌داری را نشان داد

(P<۰/۰۰۱). حجم پای تزریق شده در روز ۱۴ در مقایسه با روزهای ۳ و ۷ افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۰۱) و این افزایش در روز ۲۱ نیز در مقایسه با روز ۱۴ معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۱، جدول ۱).

جدول ۱) تأثیر تزریق آنتی بادی اینترلوکین ۱۰ بر تغییرات حجم پنجه‌ی پا

	گروه‌ها	تعداد	تغییرات حجم پا در مقایسه با روز صفر
گروه کنترل (AA)	روز صفر	۶	۰۰/۰۰±۰۰/۰۰
	روز ۳ پس از درمان	۶	۱/۱۷±۰/۰۱۹***
	روز ۷ پس از درمان	۶	۱/۳۶±۰/۰۱۷***
	روز ۱۴ پس از درمان	۶	۱/۶۱±۰/۰۱۳***
	روز ۲۱ پس از درمان	۶	۱/۸۰±۰/۰۲۳***
AA+PBS	روز صفر	۶	۰۰/۰۰±۰۰/۰۰
	روز ۳ پس از درمان	۶	۱/۲۰±۰/۰۲۱
	روز ۷ پس از درمان	۶	۱/۳۷۵±۰/۰۱۳
	روز ۱۴ پس از درمان	۶	۱/۶۵±۰/۰۰۷
	روز ۲۱ پس از درمان	۶	۱/۸۶±۰/۰۱۳
AA+Anti-IL10	روز صفر	۶	۰۰/۰۰±۰۰/۰۰
	روز ۳ پس از درمان	۶	۱/۳۶±۰/۰۲۱†
	روز ۷ پس از درمان	۶	۱/۶۲±۰/۰۱۴††
	روز ۱۴ پس از درمان	۶	۱/۸۰±۰/۰۲۶††
	روز ۲۱ پس از درمان	۶	۲/۱۲±۰/۰۲۹††,++

نتایج به‌صورت mean±SEM بیان شده و n=۶ است. روند ادم پا در روزهای ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ به‌صورت افزایشی بود. (P<۰/۰۰۱)**: مقایسه تأثیر تزریق CFA بر روی تغییرات حجم پنجه پا در روزهای مختلف در گروه کنترل AA. (P<۰/۰۵†و P<۰/۰۱††): مقایسه تاثیر تزریق آنتی‌بادی اینترلوکین ۱۰ در گروه AA + IL10 anti- با گروه کنترل مثبت AA در روزهای مشابه ۳، ۷، ۱۴، ۲۱ بعد از تزریق CFA. (P<۰/۰۰۱) ‡‡‡: مقایسه تاثیر تزریق آنتی‌بادی اینترلوکین ۱۰ در گروه AA در روز ۲۱ با گروه کنترل مثبت AA

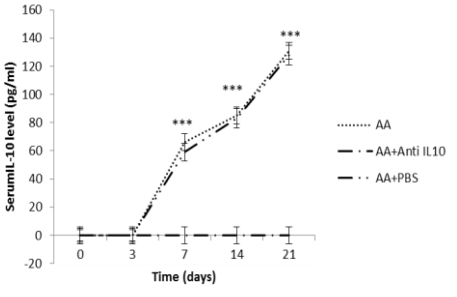
اختلاف معنی‌داری از نظر ادم پا بین گروه AA و گروه AA+PBS در روزهای مختلف مطالعه طی ۲۱ روز دیده نشد. لازم به‌ذکر است که تزریق روغن معدنی استریل در گروه کنترل هیچ‌گونه تغییری در پاسخ‌های رفتاری و مولکولی ایجاد نکرد و جهت جلوگیری از ازدحام نتایج در نمودارها اشاره نگردید.

تغییرات حجم پا به‌دنبال تزریق روزانه آنتی‌بادی اینترلوکین ۱۰ طی التهاب ناشی از CFA

تزریق درون صفاقی آنتی‌بادی اینترلوکین ۱۰ به‌صورت روزانه باعث افزایش معنی‌دار ادم ناشی از تزریق CFA در روزهای ۳ (P<۰/۰۱)، ۷، ۱۴ و ۲۱ در مقایسه با روز صفر شد (P<۰/۰۵). همچنین افزایش حجم پای CFA تزریق شده در روز ۲۱ مطالعه در گروه تیمار شده با آنتی‌بادی اینترلوکین ۱۰ نسبت به افزایش حجم پای گروه AA در روز مشابه بیشتر بود (P<۰/۰۰۱) (جدول ۱).

تغییرات سطوح سرمی اینترلوکین ۱۰ طی التهاب ناشی از تزریق CFA

تزریق CFA به کف پای راست حیوان موجب افزایش معنی‌داری در سطح سرمی اینترلوکین ۱۰ در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از تزریق گردید (P<۰/۰۰۱). مقادیر اینترلوکین ۱۰ در روزهای ۱۴ و ۲۱ افزایش یافت و این افزایش در روز ۲۱ در مقایسه با روز ۱۴ نیز معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۱). اما تزریق آنتی‌بادی اینترلوکین ۱۰ به‌صورت روزانه به‌مدت ۲۱ روز موجب کاهش معنی‌داری در سطح سرمی اینترلوکین ۱۰ شد. هیچ اختلاف معنی‌داری در مقادیر سرمی اینترلوکین ۱۰ با تزریق PBS در گروه کنترل مشاهده نگردید (نمودار ۱).



نمودار ۱) نمایش اثر تزریق آنتی‌بادی اینترلوکین ۱۰ بر تغییرات مقادیر سرمی اینترلوکین ۱۰ در طول التهاب ۲۱ روزه ناشی از CFA. نتایج به‌صورت mean±SEM بیان شده و n=۶ است. (P≤۰/۰۰۱) ***: مقایسه تاثیر تزریق CFA در سطح سرمی اینترلوکین ۱۰در گروه کنترل AA.

تغییرات هایپرآلژزی حرارتی طی مراحل مختلف AA

موش‌های آرتریتی شده به‌وسیله تزریق CFA تغییرات هیپرآلژزی حرارتی را در پای تزریق شده طی مراحل مختلف التهاب از خود نشان دادند. هیپرآلژزی به‌طور معنی‌داری در روزهای ۳ و ۷ پس از تزریق CFA در مقایسه با روز صفر افزایش نشان داد (P<۰/۰۰۱). همچنین نتایج نشان داد که التهاب مزمن موجب کاهش معنی‌دار هیپرآلژزی در روزهای ۱۴ و ۲۱ مطالعه در مقایسه با روزهای ۳ و ۷ مطالعه شد (P<۰/۰۰۱) (جدول ۲). همچنین تفاوت مشخصی در هایپرآلژزی در طی فازهای مختلف بین گروه AA و گروه PBS+AA وجود نداشت.

تغییرات هایپرآلژزی به‌دنبال تزریق روزانه آنتی‌بادی اینترلوکین ۱۰ طی التهاب ناشی از CFA

تزریق آنتی‌بادی اینترلوکین ۱۰ موجب افزایش هیپرآلژزی در رت‌های آرتریتی شده در روزهای ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ در مقایسه با گروه کنترل شد (P<۰/۰۰۱ برای روزهای ۱۴ و ۲۱ و P<۰/۰۵ برای روزهای ۳ و ۷). رت‌هایی که آنتی‌بادی اینترلوکین ۱۰ را دریافت کرده بودند در مقایسه با گروه AA افزایش معنی‌دار هیپرآلژزی را در روز ۱۴ در مقایسه با روز ۲۱ از خود نشان دادند (P<۰/۰۱) (نمودار ۲).

جدول ۲) تاثیر تزریق آنتی‌بادی اینترلوکین۱۰ بر تغییرات هایپرآلژزیا

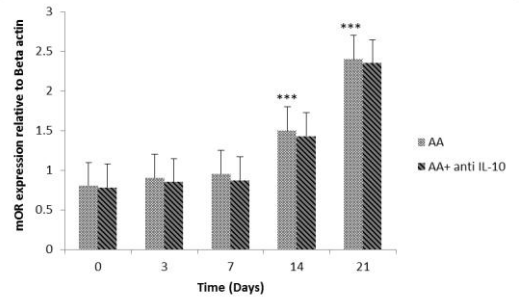
	گروه‌ها	تعداد	میانگین تفاضل زمان پس کشیدن پای راست و چپ
گروه کنترل (AA)	روز صفر	۶	۰/۶۴±۰/۰۲۴
	روز ۳ پس از درمان	۶	-۵/۱۳±۰/۱۴۳***
	روز ۷ پس از درمان	۶	-۷/۷۹±۰/۱۲۱***
	روز ۱۴ پس از درمان	۶	-۳/۹۷±۰/۱۸۴***
	روز ۲۱ پس از درمان	۶	-۲/۰۸±۰/۱۱۰***
AA+PBS	روز صفر	۶	۰/۶۷±۰/۰۲۰
	روز ۳ پس از درمان	۶	-۵/۳۰±۰/۱۵۶
	روز ۷ پس از درمان	۶	-۷/۸۸±۰/۱۱۹
	روز ۱۴ پس از درمان	۶	-۴/۰۱±۰/۱۸۰
	روز ۲۱ پس از درمان	۶	-۲/۴۱±۰/۱۴۳
AA+Anti-IL10	روز صفر	۶	۰/۶۷±۰/۲۲۱
	روز ۳ پس از درمان	۶	-۵/۸۹±۰/۰۶۶†
	روز ۷ پس از درمان	۶	-۸/۴۱±۰/۰۹۲†
	روز ۱۴ پس از درمان	۶	-۸/۹۵±۰/۱۱۴†††
	روز ۲۱ پس از درمان	۶	-۴/۴۸±۰/۲۹۷†††++

نتایج به‌صورت mean±SEM بیان شده و n=۶ است.
(P<۰/۰۰۱)***: مقایسه تأثیر تزریق CFA بر روی تغییرات هیپرآلژزی در روزهای مختلف در گروه کنترل AA. (P<۰/۰۰۱)
(P<۰/۵)†††: مقایسه تأثیر تزریق آنتی‌بادی اینترلوکین ۱۰ در گروه AA بر هیپرآلژزی در روزهای مختلف. (P<۰/۰۰۱)++: مقایسه تأثیر تزریق آنتی‌بادی اینترلوکین ۱۰ بین روزهای ۱۴ و ۲۱ بر هیپرآلژزی.

اثرات درمان با آنتی‌بادی اینترلوکین۱۰ برروی بیان گیرنده‌های مو اوپیوئیدی نخاعی در طی مراحل مختلف AA

بیان پروتئین گیرنده‌های مو اوپیوئیدی در بخش کمری طناب نخاعی گروه‌های آزمایشی مورد بررسی قرار گرفت. آنتی‌بادی پلی‌کلونال به‌منظور شناسایی پروتئین گیرنده‌های مو اوپیوئیدی در طناب نخاعی به‌کار گرفته شد اما هیچ تغییر چشمگیری در بیان گیرنده‌های مو اوپیوئیدی نخاعی تا روز هفتم التهاب در مقایسه با روز صفر در رت‌های آرتریتی شده مشاهده نگردید (نمودار ۲).

یافته‌ها بیان می‌دارند که بیان پروتئین گیرنده‌های مو اوپیوئیدی به‌طور معنی‌داری روزهای ۱۴ و ۲۱ در مقایسه با روز صفر مطالعه بالاتر بود ($P<۰/۰۰۱$). اما هیچ‌گونه تفاوتی در بیان گیرنده‌های مو اوپیوئیدی نخاعی بین رت‌های آرتریتی شده و رت‌هایی که آنتی‌بادی اینترلوکین ۱۰ را دریافت کرده بودند، وجود نداشت.



نمودار ۲) نمایش اثر تزریق آنتی‌بادی اینترلوکین ۱۰ بر تغییرات بیان گیرنده‌های مو اوپیوئیدی نخاعی طی التهاب ۲۱ روزه ناشی از CFA. تزریق آنتی‌بادی اینترلوکین ۱۰ هیچ‌گونه تأثیر معنی‌داری بر بیان پروتئین‌های گیرنده مو اوپیوئیدی نخاعی طی روزهای مختلف از خود نشان نداد. نتایج به‌صورت mean±SEM بیان شده و n=۶ است.
($P\leq۰/۰۰۱$)***: مقایسه تغییر بیان پروتئین‌های گیرنده مو اوپیوئیدی نخاعی روزهای مختلف مطالعه نسبت به روز صفر در گروه AA.

بحث

هدف از این مطالعه علاوه‌بر بررسی روند تغییرات هیپرآلژزی و ادم طی التهاب ۲۱ روزه (طولانی مدت) ناشی از CFA، بررسی روند تغییرات بیان گیرنده‌های مو اوپیوئیدی نیز بود. در ادامه این مطالعه اقدام به بررسی اثرات تزریق طولانی مدت آنتی‌بادی اینترلوکین ۱۰ به‌صورت درون صفاقی برروند علائم التهاب ایجاد شده توسط CFA نمود.

نتایج نشان داد که تزریق درون صفاقی آنتی‌بادی اینترلوکین ۱۰ به‌صورت روزانه باعث افزایش معنی‌دار التهاب ناشی از تزریق CFA در روزهای ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ در مقایسه با روزهای مشابه در گروه کنترل AA شد، همچنین تزریق این آنتی‌بادی موجب افزایش هیپرآلژزی در رت‌های آرتریتی شده در روزهای ۱۴ و ۲۱ در مقایسه با گروه کنترل شد.

آرتریت روماتوئید یک بیماری سیستمیک اتوایمیون است که با تجمع و تکثیر سلول‌های التهابی در مفصل شناخته می‌شود. اگر چه علت اصلی آن هنوز شناخته نشده، اما این موضوع مشخص شده است که ماکروفاژها، لنفوسیت‌های β، ماست سل‌ها و لنفوسیت‌های +CD۴ در طی التهاب فعال می‌شوند و در ایجاد روند التهاب سینوویال و تخریب مفصل شرکت دارند (۲۳). از سوی دیگر دانشمندان نشان داده‌اند که تزریق CFA به کف پای حیوان موجب ایجاد هیپرآلژزی مکانیکی می‌شود که التهاب طولانی مدت در پای تزریق شده ایجاد می‌نماید (۵). همچنین شماری از مطالعات اثبات کرده‌اند که آرتریت یک طرفه‌ی القاء شده به‌وسیله CFA دارای دو فاز است که در فاز اول (فاز التهاب) ترشح سایتوکاین‌های پیش التهابی مانند IL۱ β و IL۶ و TNFα افزایش می‌یابند که موجب هیپرآلژزی و ادم می‌گردند (۷).

مطالعه اخیر نیز مشابه با مطالعات انجام شده نشان داد که سطح سرمی اینترلوکین ۱۰ موجب افزایش چشمگیری در هیپرآلژزی در طول فازهای التهابی (هفته اول) و فاز آرتریتی (دو هفته بعد) AA می‌گردد. به‌علاوه، مطالعات اخیر تأکید کرده‌اند که التهاب مزمن با تغییرات فارماکولوژیکی و فیزیولوژیکی در سیستم مهاری درد در ارتباط است (۲۴). برخی میانجی کننده‌های التهابی مثل سایتوکاین‌های ضد التهابی باعث ایجاد آنالژزیا در مدل‌های حیوانی التهاب شده‌اند که این عمل را از طریق شرکت در فعال‌سازی سیستم اوپیوئیدی اندوژنز به انجام می‌رسانند که در پاسخ به التهاب محیطی فعال شده‌اند (۲۵). مطالعات پیشین،

نقش مهمی را برای اثرات بیان گیرنده‌های مو اوپیوئیدی نخاعی القاء شده با سایتوکاین‌ها بر کاهش هیپرآلژزی در طول فاز مزمن التهاب آشکار ساخته است (۲۶).

مدارک گسترده‌ای بر این مسئله تأکید دارند که افزایش در سطح برخی سایتوکاین‌های ضدالتهابی نقش مهمی را در التهاب و کاهش علائم آن ایفا می‌نماید (۱۶).

مطالعات بیان می‌دارد که اینترلوکین ۱۰ یک سایتوکاین ضد التهابی است که تولید TNFα، IL۱۲ و IFN-y را که توسط سلول‌های T.helper ۱ فعال شده بودند، مهار می‌کند و بدین‌وسیله التهاب و علائم آن نظیر درد را کاهش می‌دهند (۲۹).

IL-۱۰ توسط تنظیم کاهشی سنتز سایتوکاین‌های پیش التهابی مثل TNF-α، IL-۶، IL-۱ در تنظیم کاهشی پاسخ‌های التهابی سیتوتوکسیک و پاسخ‌های میانجی شده با سلول عمل می‌نماید.

مطالعات نشان داده است که IL-۱۰ در پاسخ به آنتی‌ژن، تکثیر و تولید سایتوکاین را از سلول‌های T مهار می‌نماید (۱۴). اینترلوکین ۱۰ اثرات خود را بر این واسطه‌ها از طریق کاهش بیان mRNA آنها و مهار فعالیت فاکتورهای رونویسی آن‌ها اعمال می‌نماید (۱۷).

برخی مطالعات نشان داده‌اند که تولید اینترلوکین ۱۰ تقریباً ۱۶-۱۲ ساعت بعد از فعال‌سازی مونوسیت‌ها در طول التهاب، فعال می‌شوند، اما نتایج مطالعه‌ی اخیر نشان داد که سطح سرمی اینترلوکین ۱۰ از روز هفتم پس از تزریق CFA افزایش می‌یابد و تا روز ۲۱ پس از تزریق CFA بالا باقی می‌ماند. همچنین گلداسمیت (Goldsmith) و همکاران بیان افزایش یافته سایتوکاین اینترلوکین ۱۰ را پس از القاء LPS گزارش داده‌اند (۲۷). علاوه‌بر این سرجی (Sergey) و همکاران اذعان داشتند که اینترلوکین ۱۰ می‌تواند پاسخ‌های التهابی القاء شده با LPS را کاهش دهد (۱۵).

دلایل پیشنهادی برای این افزایش تأخیری سرم اینترلوکین ۱۰ در طول مطالعه اخیر در مقایسه با دیگران، می‌تواند به‌دلیل اختلاف بین مدل‌های حیوانی و یا مسیرهای ایمونولوژیکی مختلف مطالعه و طراحی متفاوت مطالعه باشد.

چندین مطالعه نشان می‌دهد که تنظیم دقیق اینترلوکین ۱۰ برای برقراری هومئوستازی ایمنی در طول التهاب ضروری است. در حقیقت، تنظیم نادرست اینترلوکین ۱۰ علت عفونت‌های بی‌شمار، بیماری‌های آلرژیک و اتوایمیون می‌باشد (۲۷). نتایج این مطالعه آشکار ساخت که هیچ ارتباط معنی‌داری بین سطح افزایش یافته بیان گیرنده‌های مو اوپیوئیدی نخاعی (به‌عنوان یک کاهش دهنده هیپرآلژزی) در طول AA و تزریق آنتی‌بادی اینترلوکین ۱۰ وجود ندارد. پس بر طبق این مطالعه چنین به نظر می‌رسد که اثرات ضد هیپرآلژزی اینترلوکین ۱۰ سرمی به‌طور مستقیم از طریق اثر بر روی بیان گیرنده‌های مو اوپیوئیدی به انجام نمی‌رسد. به‌علاوه برخی مطالعات نشان داده‌اند که اینترلوکین ۱۰ می‌تواند التهاب و هیپرآلژزی را از مسیر دیگری مانند مهار تولید انواع نیتروژن و اکسیژن راکتیو به‌وسیله ماکروفاژها مهار نماید (۲۸). همچنین برخی مطالعات نشان داده‌اند که افزایش تولید مونوسیت‌ها طی التهاب می‌تواند با تحریک تولید آنتاگونیست‌های رسپتور اینترلوکین ۱۰ باعث تشدید علائم التهابی مانند هایپرآلژزی و ادم گردد (۲۸). بنابراین به‌نظر می‌رسد با مزمن شدن التهاب و تداوم حضور سایتوکاین‌ها عوامل دیگری نیز در بروز علائم محیطی و مرکزی نقش داشته باشند و این عوامل واسطه‌ای بتوانند از طرق مختلف اعم از فعال کردن سایتوکاین‌های ضدالتهابی یا تغییر روند سیگنالینگ مولکولی داخل و بین سلولی، پاسخ‌های مزمن متفاوت با فاز حاد را نشان دهند

(۲۹،۳۰). با توجه به‌اینکه این مطالعه تنها به بررسی اثرات ضدالتهابی اینترلوکین ۱۰ و نقش آن بر بیان گیرنده‌های مو نخاعی طی التهاب پرداخته است، به‌نظر می‌رسد که در صورت همراه بودن با بررسی مقادیر نخاعی این سایتوکاین و روند سیگنالینگ داخل سلولی آن نتایج متقن‌تر می‌شد.

نتیجه‌گیری

مطالعات ما نشان داد که استفاده از آنتی‌بادی اینترلوکین ۱۰ موجب القاء هیپرآلژزی و ادم طی مراحل مختلف التهاب القاء شده با CFA می‌گردد. همچنین این یافته‌ها پیشنهاد می‌کنند که طی التهاب بیان گیرنده‌های اوپیوئیدی مو در فاز مزمن با افزایش همراه است اما این افزایش، احتمالاً از طریق تأثیر مستقیم اینترلوکین ۱۰ میانجی‌گری نمی‌شود و مکانیسم‌هایی که در سیگنالینگ داخلی سلولی درگیر شده‌اند، نیازمند تحقیق و بررسی بیشتر می‌باشند.

سپاس و قدردانی

این مطالعه با حمایت معاونت تحقیقات و فناوری ریاست جمهوری و مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شده است.

References:

1.Scott LD, Wolfe F, Huizinga WJ. Rheumatoid arthritis. Lancet 2010; 376: 1094–1108.
2.Baumgartner S. Eternercept (Enbrel) in patients with rheumatoid arthritis with recent onset versus established disease: improvement in disability. J Rheumatol 2004; 31: 1532-7.
3.Feghali CA, Wright TM. Cytokines in acute and chronic inflammation. Front Biosci 1997, 2:12-26.
4.Möller B, Villiger PM. Inhibition of IL-1, IL-6, and TNF-alpha in immune-mediated inflammatory diseases. J Immunopathol 2006; 27:391-408.
5.Hargreaves K, Dubner R, Brown F, et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. Pain 1988; 32(1):77-88.
6.Philippe L, Gegout-Pottie P, Guingamp C, et al. Relations between functional, inflammatory, and degenerative parameters during adjuvant arthritis in rats. Am J Physiol 1997; 273: 1550-6.
7.Chover-Gonzalez AJ, Harbuz MS, Tejedor-Real P, et al. Effects of Stress on Susceptibility and Severity of Inflammation in Adjuvant-induced Arthritisa. Ann New York Acad of Sci 1999; 876(1):276-86.
8.Back SK, Lee J, Hong SK et al. Loss of spinal μ-opioid-receptor is associated with mechanical allodynia in a rat model of peripheral neuropathia. Pain 2006; 123:117.-26
9.Zhao M. Wang JY. Jia H. et al. μ- but δ- and κ- opioid receptors in the ventro lateral orbital cortex mediate opioid-induced anti allodynia in a rat neuropathic pain model. Brain Res 2006; 1076:68-77.
10.Thomas J, Martin JT, Eisenach CJ. Pharmacology of Opioid and Nonopioid Analgesics in Chronic Pain States. J pharmacol ther 2001; 299: 811-17.
11.Medeiros R, Figueiredo CP, Pandolfo P, et al. The role of TNF-α signaling pathway on COX-2 upregulation and cognitive decline induced by β-amyloid peptide. Behav Brain Res 2010; 209:165-73.
12.Heiskanen M, kahonen M, Huume M, et al. polymorphism in the IL10 promoter region and early markers of atherosclerosis: The cardiovasvular risk in young finns study. Atherosclerosis 2010; 208:190-96.
13.Kontoyiannis D, Kotlyarov A, Carballo E, , et al. Interleukin-10 targets p38 MAPK to modulate ARE-dependent TNF mRNA

translation and limit intestinal pathology. The EMBO J 2001; 20:3760–70.
14.Hedrich CM, Ramakrishnan A, Dabitao D, et al. Dynamic DNA methylation patterns across the mouse and human IL10 genes during CD4+ T cell activation; influence of IL-27. Mol Immunol 2010; 48: 73–81.
15.Sergey G, Palmer Ch. Interleukin-10 inhibits endotoxin-induced pro-inflammatory cytokines in microglial cell cultures. **J** Neuroimmunol 2005; 162:71-80.
16.Kanaan S, Poole S, Nayef ES, et al. Interleukin-10 reduces the endotoxin-induced hyperalgesia in mice Top of Form. J Neuroimmunol 1998; 86: 142-50.
17.Malefyt R, Abrams J, Bennett B, et al. Interleukin 10 inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an auto regulatory role of IL-10 produced by monocytes. J Exp Med 1991; 174:1209–20.
18.Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain on conscious animals. Pain 1983; 16:109–10.
19.Tekieh E, Zaringhalam J, Manaheji H, , et al. Increased serum IL-6 level time-dependently regulates hyperalgesia and spinal mu opioid receptor expression during CFA-induced arthritis. EXCLI J 2011; 10:23-33.
20.Khadaroo RG, Fan J, Powers KA, et al. Impaired induction of IL10 expression in the lung following hemorrhagic shock. Shock 2004; 22:333-9
21.Kurien BT, Scofield RH. Western blotting. Methods 2006; 38: 283-93.
22.Akhtari Z, Zaringhalam J, Eidi A, et al. Bidirectional effects of serum TNFα level and spinal P38MAPK phosphorylation on hyperalgesia variation during CFA- induced arthritis. EXCLI J 2012; 11: 373-85.
23.Anousheh S, Joseph C. Rheumatoid arthritis: A review of the cutaneous manifestations. J Am Acad Dermatol 2005; 53: 191-209.
24.Hammonnd DL. Persistent inflammatory nociception and hyperalgesia. Hyperalgesia: molecular mechanism and clinical implication. First ed. IASP press 2004; 291-310.
25.Messmer D, Hatsukari I, Hitosugi N, et al. morphine Reciprocally Regulates IL-10 and IL-12 Production by Monocyte-Derived Human Dendritic Cells and Enhances T Cell Activation. Mol Med 2006; 12: 284-90.
26.Zaringhalam J, Manaheji H, Mghsoodi N, et al. Spinal mu opioid receptor expression and hyperalgesia with dexamethasone in chronic adjuvant-induced arthritis in rats. Clin Exp PharmacolPhysiol 2008; 10: 1-7.
27.Goldsmitha M, Avnia D, Ernst O, et al. Synergistic IL-10 induction by LPS and the ceramide-1-phosphate analog PCERA-1 is mediated by the cAMP and p38 MAP kinase pathways. Mol Immunol 2009; 46:1979–87.
28.Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. Nat Rev Immunol 2005; 5: 271-83.
29.Sabat R. IL10 family of cytokines. Cytokine Growth F R 2010; 21:315-24.
30.E. Tekieh ,S. Moghadam kia, A. Eidi, et al. Investigation on the anti- inflammatory and analgesic effects of Olea europaea L. metanolic extract on male NMRI mouse. Iranian South Med J (ISMJ). 2012, 1: 220-9.

ISMJ 2015; 17(6): 1176-1187

Original Article

Relation cellular- molecular between serum IL10 levels and hyperalgesia variation in adjuvant-induced arthritis

Z. Akhtari [1], J. Zaringhalam [2*], A. Eidi [1], A. haeriRuhani [1], H. Manaheji [2], E. Tekieh [2]

[1] Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, IRAN.

[2] Physiology Department, Neuroscience Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Science, Tehran, IRAN.

(Received 3 Jun, 2013 Accepted 7 Jul, 2013)

Abstract

Background: Regarding to the important anti-inflammatory role of IL10 during inflammation process and hyperalgesia and edema variation during CFA-induced arthritis and also the increase of Spinal mu opioid receptor (mOR) expression, in this study researchers investigate the role of serum IL10 level on mOR expression and edema and hyperalgesia variation during different stages of Complete Freund`s Adjuvant (CFA) - induced arthritis in male Wistar rats.

Materials and Methods: Mono-arthritis was induced by CFA and inflammatory symptoms (hyperalgesia and edema) were assessed on 0, 3, 7, 14th and 21st days of study. Anti-IL10 was administered during the 21 days of study in different experimental groups. mOR expression were detected by western blotting on 0, 3,7, 14th and 21st days of study. Data was analyzed by SPSS statistical software version 19 with using one way ANOVA (post hoc Tokey's).

Results: Our results showed that anti-IL10 administration in AA group (Adjuvant Arthritis) caused an increase in the paw volume and hyperalgesia until 21st of study. Our study stated that there were no significant differences in spinal mOR expression between AA and AA+anti-IL10rats.

Conclusion: Our study confirmed that anti-IL10administration caused to hyperalgesia and edema during AA inflammation. Also these findings suggested that mOR expression increased in chronic phase of AA inflammation, however an increase in the level of spinal mu opioid receptor (mOR) expression during AA inflammation is not mediated directly via the effect of serum IL-10.

Key word: Inflammation, Hyperalgesia, Edema, CFA, IL-10, mOR expression

***Address for correspondence**: Physiology Department, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran,IRAN. Email: jzaringhalam@yahoo.com