

## The effect of nimesulide on Cox<sub>II</sub> expression in central and peripheral immune cells (microglia and macrophage) in a rat model of neuropathic pain

Taraneh Moini-Zanjani<sup>1\*</sup>, Seyed Nasser Ostad<sup>2</sup>, Nariman Mosaffa<sup>3</sup>, and Noushine Amini<sup>2</sup>

1. Dept. Pharmacology and Neurosciences Research Center, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Dept. Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3. Dept. Immunology, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

### Abstract

**Introduction:** Neuropathic pain may be due to a primary insult to the peripheral or central nervous system. It seems that immune cells play an important role in the development and maintenance of chronic pain. Nimesulide, a highly selective Cox<sub>II</sub> inhibitor, effectively reduces hyperalgesia due to peripherally administration of inflammatory agents like formalin. In this study we have investigated the effect of nimesulide on pain behavior and Cox<sub>II</sub> expression in macrophage and microglial cells in neuropathic pain condition.

**Methods:** Male Wistar rats (150-200 g) were divided into 5 different groups: 1) CCI + saline 2) Sham + saline (control), 3) CCI + Nimesulide (1.25, 2.5 or 5 mg/kg). Neuropathic pain was induced using Bennet and Xie model. Warm water (42 °C) for thermal hyperalgesia and Von Frey filaments for mechanical allodynia were respectively used as pain behavioral tests. Experiments were performed on day before and days 1, 3, 5, 7, 10 and 14 days post injury. At day 14 rats which received nimesulide 5 mg/kg were killed and Cox<sub>II</sub> was assessed in macrophages and microglial cells.

**Results:** Nimesulide 2.5 and 5mg/kg reduced hyperalgesia and allodynia. Nimesulide 5 mg/kg also reduced Cox<sub>II</sub> expression in macrophages and microglial cells compared to CCI + saline group.

**Conclusion:** Nimesulide reduced hyperalgesia due to nerve inflammation. Cox<sub>II</sub>-induced PGs activates a wide range of immune cells like macrophages and microglia. It seems that nimesulide a highly selective Cox<sub>II</sub> inhibitor can reduce effectively neuropathic pain.

**Keywords:** Nimesulide, neuropathic pain, hyperalgesia, allodynia, Cox<sub>II</sub>

\* Corresponding Author Email: tzanjani@yahoo.com  
Available online @: www.phypha.ir/ppj

## بررسی اثر نیمسولید بر بیان آنزیم COX<sub>II</sub> در سلول‌های ایمنی مرکزی (میکروگلیا) و سلول‌های ایمنی محیطی (ماکروفاژ) در شرایط درد نوروباتیک در موش صحرایی

ترانه معینی‌زنجانی<sup>۱\*</sup>، سید ناصر استاد<sup>۲</sup>، نریمان مصفا<sup>۳</sup> و نوشین امینی<sup>۲</sup>  
۱. دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه فارماکولوژی و مرکز تحقیقات علوم اعصاب  
۲. دانشگاه تهران، دانشکده داروسازی، آزمایشگاه سلولی و مولکولی گروه سم‌شناسی و داروشناسی.  
۳. دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه ایمنولوژی  
دریافت: تیر ۸۶      بازبینی: مهر ۸۶      پذیرش: آبان ۸۶

### چکیده

**مقدمه:** درد نوروباتیک اختلال عملکرد سیستم اعصاب مرکزی و محیطی می‌باشد. هیپرالژزیا و آلودینیا بعثت ریلیز پروستاگلاندین‌ها و سیتوکین‌های التهابی در نخاع ایجاد و احتمالاً سلول‌های ایمنی نقش مهمی در پیشبرد آن داشته باشند. نیمسولید مهار کننده آنزیم COX با تمایل بیشتر برای COX<sub>II</sub> در هیپرالژزیا ناشی از عوامل التهاب زای محیطی نظیر فرمالین نسبت به مهار کننده‌های اختصاصی COX<sub>II</sub> موثرتر بوده، در درد نوروباتیک نیز بررسی و اثرات این ترکیب بر بیان COX<sub>II</sub> در ماکروفاژها و میکروگلیاها در محیط کشت ارزیابی شد.

**روش‌ها:** در موش‌های صحرایی نر، از نژاد (Wistar 150-200g, n=6) در سه گروه براساس مدل (Bennet & Xie) درد نوروباتیک ایجاد شد شامل: گروه Sham saline، CCI saline، drug CCI. نیمسولید ۱،۲۵-۵-۲،۵ میلی‌گرم/کیلوگرم (I.P) استفاده شد. بررسی رفتار درد با تست‌های هیپرالژزیا حرارتی و آلودینیا مکانیکی انجام شد. آزمایشات قبل و در روزهای ۱۴، ۱۰، ۷، ۵، ۳، ۲ بعد از عمل انجام شدند، روز ۱۴ حیواناتی که نیمسولید ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم دریافت نمودند، را کشته و سلول‌های ماکروفاژ و میکروگلیا جهت بررسی بیان آنزیم توسط روش ایمنوسیتوشیمی آماده شدند. گروهها توسط روش آماری ANOVA و T-test مقایسه شدند. در بررسی بیان آنزیم، داده‌ها بر اساس % SD گروه کنترل (Sham) مقایسه شدند.

**یافته‌ها:** در حیواناتی که نیمسولید (۵-۲،۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) دریافت نمودند، کاهش معنی داری در رفتار درد ایجاد شد. نیمسولید ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم بیان COX<sub>II</sub> را در سطح سلول‌های ماکروفاژ و میکروگلیا در مقایسه با گروه CCI saline کاهش داد.

**نتیجه‌گیری:** نیمسولید هیپرالژزیا ناشی از التهاب عصب را در مدل نوروباتی بطور موثری کاهش داد. آنزیم COX<sub>II</sub> با ایجاد PGها موجب فعال شدن طیفی از سلول‌های ایمنی از جمله ماکروفاژها و میکروگلیاها می‌گردد. بنابراین به نظر می‌رسد نیمسولید که مهار کننده با تمایل زیاد برای آنزیم COX<sub>II</sub> می‌باشد، تاثیر مناسبی در کاهش دردهای التهابی داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: نیمسولید، درد نوروباتیک، هیپرالژزیا، آلودینیا، COX<sub>II</sub>

### مقدمه

طناب نخاعی و اعصاب محیطی می‌باشد (۴۶). در طی این نوع صدمات، تغییراتی در سطح سلول‌های عصبی به‌وجود می‌آید. در طی چند سال اخیر مشخص شده است که در طی این صدمات ماکروفاژها از سلول‌های ایمنی محیطی و سلول‌های گلیال در سیستم اعصاب مرکزی فعال گشته و مجموعه‌ای از مدیاتورها را آزاد می‌کنند از جمله سیتوکین‌های التهابی را که امروزه نقش

درد نوروباتیک یک درد مزمن با منشأ مرکزی یا محیطی است که به‌دلایل مختلف ایجاد می‌شود که مهمترین آنها صدمات

tzanjani@yahoo.com  
www.phypha.ir/ppj

\* نویسنده مسئول مکاتبات:  
وبگاه مجله:

است برای اثبات بخشی از این مکانیزم‌ها. اینکه سلولهای میکروگلیا در سیستم اعصاب مرکزی و ماکروفاژهای محیطی تا چه محدوده‌ای برای تقویت این پیام نقش دارند، در این تحقیق به واسطه COXII، محور عملکردی آن‌ها احتمالاً به اثبات می‌رسد و در این رابطه از نیمسولید که از گروه مهارکننده‌های با تمایل بالا برای مهار COXII می‌باشد، به جهت بررسی دخالت این آنزیم در درد نوروپاتی و تاثیر آن بر بیان COXII که در دردهای مزمن التهابی در سلولهای ایمنی افزایش می‌یابد استفاده شد. سنجش بیان COXII در کشت ماکروفاژهای مشتق از مونوسیت‌های در گردش و نیز بررسی وضعیت آن در سلول‌های میکروگلیای طناب نخاعی در تولید این آنزیم، می‌تواند ابزار مهمی در فهم محور سیستمیک- موضعی درد باشد. بنابراین تاثیر داروی فوق بر این محور، نقش COXII را در هدایت مکانیزم این روند به اثبات می‌رساند. به این منظور روش فشردگی مزمن عصب، Chronic Constriction Injury (CCI) که توسط Bennett و Xie در سال ۱۹۸۸ ارائه شد جهت ایجاد درد مزمن نوروپاتی مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به اینکه مدل CCI یک مدل درد نوروپاتی با منشأ التهابی است، کاهش پاسخ‌های التهابی توسط عوامل فارماکولوژیک احتمالاً یک استراتژی مناسب جهت جلوگیری و پیشرفت درد نوروپاتی باشد. بنابراین با توجه به اهمیت پاسخ‌های ایمنی و التهابی و نقش سلولهای ایمنی در این رابطه و فعال شدن ماکروفاژها و میکروگلیاها بدنبال صدمات بافتی و ایجاد التهاب و درد در موضع چنانچه دارویی بتواند به طریقی موجب تضعیف این مسیر گردد احتمالاً اثرات مفیدی در تسکین دردهای مزمن داشته باشد.

## مواد و روش‌ها

در این تحقیق از موش صحرایی نر نژاد Wistar در محدوده وزنی ۱۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی در دمای  $22 \pm 2$  درجه سانتیگراد قرار می‌گرفتند و در تمام مدت آزمایش مقدار کافی آب و غذا در اختیار آن‌ها گذاشته می‌شد. حیوانات به صورت تصادفی در ۳ گروه آزمایشی تقسیم شدند و در هر گروه از ۶ حیوان استفاده شد. در کلیه موارد اعم از جراحی یا بررسی تست‌های

مهمی برای آنها در زمینه دردهای مزمن مطرح شده است (۲۹، ۳۰). تحقیقات جدید دلالت بر نقش مهم سلولهای ایمنی به عنوان مدولاتورهای درد نه تنها در بافت ملتهب بلکه در اعصاب محیطی و مرکزی دارند (۴۲، ۴۳، ۱۵، ۲۹). همچنین افزایش در بیان آنزیم COXII بوجود می‌آید که مجموعه این عوامل در تداوم و برقراری درد دخالت می‌نمایند (۴۹). قبلاً تصور بر این بود که سلولهای گلیال، سلولهای پشتیبان و محافظت کننده سلولهای عصبی هستند در حالیکه امروز به دنبال تحقیقات گسترده نقش سلولهای گلیال را در دردهای مزمن مطرح می‌سازند (۱۳، ۳۰، ۳۳، ۴۲). درد نوروپاتی یک نوع درد مزمن می‌باشد و نقش سیتوکین‌ها (۲۹، ۳۰، ۴۲) و COXII (۱۶، ۲۶، ۲۷، ۲۸، ۴۸) به عنوان مدیاتورهای التهاب و فعال کننده گیاهای سیستم اعصاب مرکزی که از عوامل شناخته شده التهابی در مسیر درد نیز می‌باشند، مشخص شده است (۱۵، ۲۹، ۴۲، ۴۳). به نظر می‌رسد سیتوکین‌های التهابی از عواملی هستند که در طی صدمات نخاعی در سلولهای ایمنی محیطی و مرکزی (ماکروفاژها و میکروگلیاها) و نورونها بیان می‌شوند و از جمله عوامل القا کننده COXII نیز می‌باشند (۲۰، ۴۱، ۴۳). درد ایجاد شده در شرایط صدمات اعصاب نخاعی بخشی به علت حضور این عوامل توجیه شده است (۳۰، ۴۹). دردهای التهابی و دردهای نوروپاتی که منشا محیطی دارند اغلب افزایش حساسیت موضعی پوستی به فرم هیپرالژزیا و آلودینیا نشان می‌دهند (۴۳). از مدل‌های حیوانی مختلف جهت ایجاد درد نوروپاتی و بررسی رفتار درد استفاده می‌شود که شرایط نظیر درد نوروپاتی در انسان را تقلید می‌نمایند و تاکنون تحقیقات بر مدل‌های صدمه به اعصاب محیطی خصوصاً عصب سیپاتی و اعصاب نخاعی تکیه داشته‌اند (۴، ۲۱، ۳۲، ۳۹). نیمسولید به دلیل اثرات اختصاصی و منحصر به فرد تأثیرات مناسبی در دردهای مزمن به جای گذاشته است (۴). لذا این دارو را میتوان بعنوان الگویی در کاهش درد ناشی از فعال شدن عوامل التهاب‌زا در درد نوروپاتی مورد مطالعه و بررسی قرار داد. علی‌رغم پیشرفت تحقیقات در زمینه کشف مکانیزم‌های هیپرالژزیا و اینکه چگونه درد از موضع التهاب و ضایعه به مراکز سیستم اعصاب مرکزی منتقل می‌گردد و پیام تشدید شده از این مراکز صادر می‌شود، هنوز سؤالات و ابهامات بسیاری در این زمینه وجود دارد. این تحقیق کوششی

نیمسولید، روزانه یک ساعت و نیم قبل از انجام تستهای رفتاری در طی مدت چهارده روز آزمایش بصورت I.P تجویز شد. از تمام حیوانات در روز صفر یعنی قبل از انجام عمل جراحی، تستهای رفتاری بعمل آمد که این روز بعنوان روز کنترل در نظر گرفته شد. سپس در روزهای ۱، ۳، ۵، ۷، ۱۰ و ۱۴ تستها تکرار شدند. پس از حصول اطمینان از ایجاد نوروپاتی که به واسطه تستهای رفتاری درد (آلودینیا و هیپرالژزیا) صورت می‌گرفت، در روز ۱۴ حیوانات را با ایجاد کمترین استرس ابتدا با CO<sub>2</sub> بی‌درد (Euthanized) نموده و جهت ارزیابی میزان CO<sub>2</sub> اقدام به جدا نمودن ماکروفاژهای در گردش خون محیطی و میکروگلیاهای طناب نخاعی می‌نمودیم.

برای آزمون آلودینیای مکانیکی از تارهای Von Frey Filaments (VFF) جهت ارزیابی حساسیت پوست به تحریکات تماسی استفاده شد. به جهت تطابق با محیط، ۱۵ دقیقه قبل از آزمایش حیوانات درون یک محفظه شفاف و بر روی یک صفحه مشبک قرار می‌گرفتند. سپس تارهای (VFF) را به ترتیب از ۲-۴-۶-۸-۱۵-۲۶-۶۰ گرم به ترتیب در جهت افزایش قطر تارها بصورت فشار ملایم در سطح کف پای چپ در قسمت پاشنه پا اعمال نموده و آستانه کشیدن پا Paw Withdrawal Threshold (PWT) را به عنوان حداقل گرم نیروی وارده برای پای تحت فشار در نظر گرفته که به عبارت دیگر حداقل فشار مورد نیاز جهت رفلکس کشیدن پا می‌باشد (33). برای هر تار دو بار متوالی به فاصله یک دقیقه رفتار درد را در حیوان بررسی نموده و میانگین نیروی وارده در حیوانات محاسبه می‌شد (n / تعداد موشهای پاسخ دهنده × گرم نیروی وارده) = PWT (13).

برای آزمون هیپرالژزیای حرارتی، پای حیوان به داخل ظرف آب با حرارت ۴۲ درجه سانتیگراد قرار داده شد و فاصله زمانی بین وارد کردن پا به داخل آب و عقب کشیدن آن توسط یک کروномتر اندازه‌گیری و برای هر درجه حرارت این عمل ۲ بار تکرار می‌گردید (PWL) Paw Withdrawal Latency از فرمول زیر محاسبه می‌شد:

زمان مربوط به پای سالم - زمان مربوط به پای آسیب دیده = PWL  
فاصله‌های زمانی بین دفعات آزمایش حداقل ۵ دقیقه بود. میانگین ۲ زمان بدست آمده نشان دهنده میزان تحمل حیوان بود (8).

برای جدا سازی، تخلیص و غنی سازی ماکروفاژهای مشتق از مونوسیت، در شرایط کاملاً استریل (پس از بی‌درد نمودن حیوان، و

رفتاری از روش‌های استاندارد مربوط به قوانین اخلاقی انجمن بین‌المللی مطالعه و بررسی درد (IASP) استفاده گردید (۵۰).

گروه‌های آزمایشی عبارت بودند از: ۱- گروه حیوانات نوروپاتی و سالین (CCI saline): در این گروه عصب سیاتیک توسط روش CCI تحت فشار بوده و سالین دریافت نمودند. ۲- گروه حیوانات نوروپاتی و دارو (CCI drug): در این گروه عصب سیاتیک توسط روش CCI تحت فشار بوده و نیمسولید دریافت نمودند. ۳- گروه حیوانات غیر نوروپاتی و سالین (Sham saline): این گروه تنها تحت جراحی قرار گرفته و فقط سالین دریافت نمودند.

داروهای مورد استفاده عبارت بودند از نیمسولید (سیگما آمریکا) که در سالین (کلرور سدیم ۰/۹٪) بصورت سوسپانسیون تهیه می‌شد، کتامین و گزایلازین (سیگما آمریکا) که به صورت محلول آماده استفاده می‌شدند. در کشت سلولی از محیط کشت RPMI 40 و Lebowitz، سرم جنین گاو FBS-HI، بافر شستشو HBSS، پنی‌سیلین / استرپتومایسین، فایکول 1074 Ficol، پرکول Percoll، تریپسین، آنتی‌بادی مونوکلونال CD11b:Biotin (MRC OX-42) Mouse Anti Rat، کیت CoxII و Poly-D-Lysine که از سیگما تهیه شدند، استفاده شد. DNAase از Fermentas کانادا، Streptavidin-HRP و Di- Amino- Benzidine (DAB) از Serotec آمریکا تهیه شدند.

برای ایجاد فشردگی روی عصب سیاتیک، ابتدا حیوانات با تزریق مخلوط کتامین ۶۰ میلیگرم/کیلوگرم و گزایلازین ۱۰ میلیگرم/کیلوگرم بصورت I.P، بیهوش شدند. سپس موهای ناحیه ران حیوان در روی پای چپ تمیز و شکافی به طول ۲ سانتیمتر روی پوست و عضله ایجاد گردید. پس از مشاهده عصب سیاتیک براساس مدل ارائه شده توسط Bennett and Xie (1988) (۵)، با استفاده از نخ ۴/۰ کرومیک، ۴ گره شل به فواصل یک میلیمتر روی عصب زده شد. سپس عضله و پوست بخیه شده و روی آن با بتادین ضد عفونی شد. پس از اتمام جراحی، حیوان به اتاق مخصوص نگهداری حیوانات منتقل شد. اعمال جراحی در محیط استریل انجام شدند.

در گروه نوروپاتی (CCI)، عصب سیاتیک پای چپ حیوان تحت فشار قرار گرفت. در گروه Sham اعمال جراحی صورت گرفت اما بعد از دیدن عصب بدون گره زدن آن مجدداً عضلات و پوست بخیه شدند. در گروه CCI drug، نیمسولید با دوزهای (۲/۵-۱/۲۵ و ۵) میلیگرم/کیلوگرم بصورت I.P تجویز شدند.

و پس از شستشو به Pellet حاوی سلولها محیط کامل اضافه، از نایلون مش رد نموده و پس از شمارش به تعداد  $1 \times 10^6$  سلول در Slide chamber قرار داده و در انکوباتور  $CO_2$  انکوبه می‌شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، محیط کشت سلولها را خالی و به محض خشک شدن، سلولها توسط متانول فیکس و تا ارزیابی  $COX_{II}$  در محیط PBS نگهداری می‌شدند.

جهت سنجش میزان  $COX_{II}$  در کشت سلولهای ماکروفاژ و میکروگلیا از روش ایمنوسیتوشیمی استفاده شد. در این روش به سلولهای فیکس شده، بعد از چندین مرحله شستشو با PBS، Tris و بکار بردن  $H_2O_2$  آنتی بادی اولیه به محیط آنها اضافه و پس از گذشت ۲۴ ساعت Streptavidine-HRP به سلولها اضافه و به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند و در نهایت توسط کروموژن DAB نقاط قهوه‌ای رنگ توسط میکروسکوپ نوری شناسایی می‌شدند.

به جهت اطمینان از خلوص ماکروفاژهای حاضر در محیط کشت با استفاده از رنگ آمیزی (NSE) به کمک بافر مخصوص سلولها رنگ آمیزی شده و در صورت قهوه‌ای-آجری شدن سیتوپلاسم سلولها و شمارش تعداد سلولهای رنگ شده تا خلوص ۹۰٪ مورد قبول آزمایشگاهی قرار می‌گیرد.

شناسایی میکروگلیا به دو روش انجام شد: الف- به روش استاندارد ایمنوسیتوشیمی صورت گرفت. در این روش از آنتی بادی بیوتینه OX-42 جهت شناسایی رسپتور غشائی CR3 / CD 11b در سلولهای میکروگلیا استفاده شد. ابتدا سلولها توسط اسید الکل سرد فیکس و بعد از چندین مرحله شستشو با PBS، Tris و بکار بردن  $H_2O_2$  آنتی بادی اولیه به محیط سلولها اضافه و به مدت ۲۴ ساعت درون اتافک مرطوب در یخچال قرار داده شدند. روز بعد، Streptavidine-HRP بعد از شستشو به سلولها اضافه و به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند و در نهایت توسط کروموژن DAB نقاط قهوه‌ای رنگ توسط میکروسکوپ نوری شناسایی می‌شدند. ب- به روش رنگ آمیزی توسط گیمسا صورت گرفت. در این روش سلولها درون فلاسک قرار داده شدند و بعد از confluent شدن، توسط متانول فیکس، سپس با گیمسا رنگ آمیزی شده و پس از شستشو، با میکروسکوپ نوری مشاهده می‌شدند.

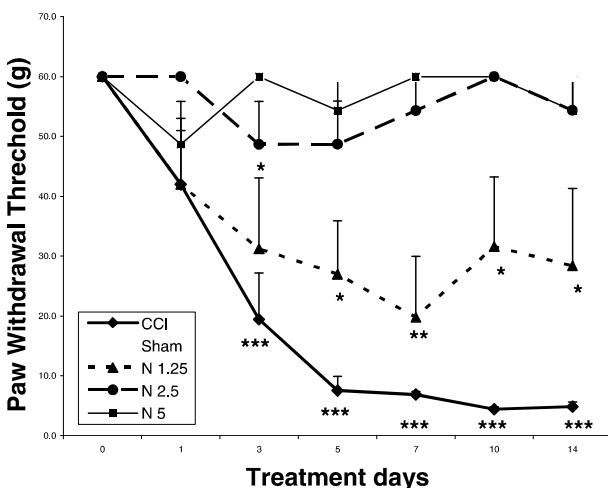
جهت بررسی میزان زنده بودن سلولها از این آزمون استفاده می‌شد. در این روش یک قطره از سوسپانسیون سلولی را با یک قطره از محلول تریپان بلو بر روی لام مخلوط و با عدسی ۴۰، درصد سلولهای زنده محاسبه می‌شد. در این روش سلولهای زنده

قطع نخاع به روش Cervical dislocation و باز کردن قفسه سینه) خون از قلب حیوان گرفته محیط RPMI به آن اضافه و روی فایکول منتقل و به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ می‌شدند. به این ترتیب لایه سلولهای تک هسته‌ای توسط گرادیان فایکول جدا می‌شد. بعد از جدا کردن حلقه، از محیط کامل RPMI Complete Tissue Culture Medium (CTCM) و FBS و Penicillin/Streptomycin به میزان به ترتیب ۱۰۰ cc، ۱۰ cc و ۱۰ cc (۱) اضافه و پس از شمارش، تعداد  $2.5 \times 10^5$  سلول در Slide chamber قرار داده و محیط کامل اضافه می‌شد. پس از گذشت ۴ ساعت از انکوباسیون و چسبیدن ماکروفاژها به ته پلیت، محیط روئی را خالی و محیط کامل اضافه می‌شد که در این صورت تعداد  $5 \times 10^5$  سلول ماکروفاژ در هر خانه قرار می‌گرفتند (۲۸). سلولها در انکوباتور  $CO_2$  (۵٪) در دمای  $37^\circ C$  انکوبه می‌شدند. بعد از ۲۴ ساعت، محیط کشت سلولها را خالی نموده به محض خشک شدن، سلولها را توسط متانول فیکس نموده و تا ارزیابی  $COX_{II}$  در محیط PBS نگهداری می‌شدند.

برای جدا سازی، تخلیص و غنی سازی میکروگلیای طناب نخاعی، در شرایط کاملاً استریل موه‌های پشت حیوان قطع نخاعی شده را تراشیده با الکل ۷۰ درصد ضد عفونی و قطعه ستون مهره‌ها را جدا و توسط عمل فلاشینگ، نخاع به‌طور کامل از انتهای ستون مهره‌ها بیرون آورده و پس از برداشتن پرده‌های منژ توسط پنس‌های ظریف، قطعه کمربندی توسط اسکالپل قطع و به پتری دیش حاوی Trypsin/DNAase منتقل می‌شد و به مدت یک ساعت و نیم در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد قرار می‌گرفتند و در پایان توسط FBS واکنش را متوقف و پس از انتقال قطعات به لوله فالکون، محیط کامل (CTCM (FBS-HI, Lebowitz) و Penicillin/Streptomycin) به جهت شستشو سلولها و حذف تریپسین، اضافه نموده و بعد از سانتریفوژ و خالی کردن مایع، به Pellet حاوی سلولها محیط کامل اضافه و عمل Trituration را بر روی یخ انجام می‌شد تا محلول حاوی سلولها کاملاً هموزنیزه و نوزنها جدا شوند. سلولها را از نایلون مش ۲۰ میکرومتر رد نموده و با استفاده از پرکول ۸۰٪ (یا سوکروز) به مدت ۴۵ دقیقه با دور 18000 rpm سانتریفوژ می‌شدند. به این ترتیب سلولهای میکروگلیا به صورت یک حلقه خاکستری بین لایه میلین از بالا و گلبولهای قرمز از پائین، جدا می‌شدند (۱). حلقه میکروگلیا را به لوله حاوی محیط کامل منتقل

نمودار ۲ نشان دهنده تفاوت زمان تحمل بین پای آسیب دیده و پای سالم در گروههای مورد آزمایش است. در این نمودار حیواناتی که تحت عمل فشردگی عصب قرار گرفته بودند (گروه CCI saline) از روز سوم اختلاف معنی داری در میزان تحمل نسبت به آب  $42^{\circ}\text{C}$  در مقایسه با روز کنترل نشان دادند ( $P < 0.05$ ) که تا آخرین روز آزمایش ادامه یافت ( $P < 0.001$ ) و نشان دهنده حس درد در حیوانات بوده است. در حیوانات گروه Sham saline تغییری در هیچیک از روزهای آزمایش نسبت به روز کنترل مشاهده نشد. حیواناتی که دارو دریافت کردند نیمسولید با دوز  $1/25$  میلیگرم/کیلوگرم قادر به کاهش حس درد نبوده است ( $P < 0.05$ ). دوزهای  $2/5$  و  $5$  میلیگرم/کیلوگرم تغییر معنی داری در زمان تحمل به درد در مقایسه با روز کنترل ایجاد نمودند.

همانطور که در نمودار ۳ مشاهده می شود، اختلاف معنی داری ( $P < 0.001$ ) بین گروه CCI saline و گروه حیوانات تحت درمان با نیمسولید  $5$  میلیگرم/کیلوگرم از نظر میزان بیان COXII ایجاد شد. دادهها براساس در صد SD گروه کنترل (Sham) مقایسه شدند. همانطور که در نمودار ۴ مشاهده می شود، اختلاف معنی داری ( $P < 0.001$ ) بین گروه CCI saline و گروههایی که نیمسولید  $5$  میلیگرم/کیلوگرم دریافت نمودند از نظر میزان بیان COXII ایجاد شد. دادهها براساس در صد SD گروه کنترل (Sham) مقایسه شدند.

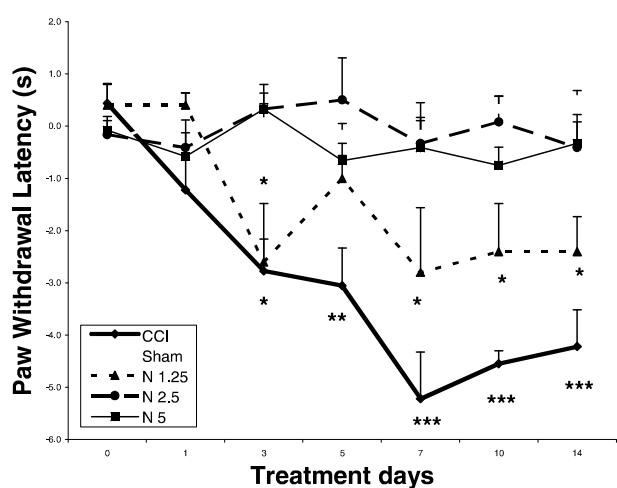


**نمودار ۲- پاسخ به تارهای Von Frey** در گروه های آزمایشی مختلف تحت تاثیر نیمسولید  $1, 2, 5, 10, 25$  و  $5$  میلیگرم/کیلوگرم طی  $14$  روز بعد از جراحی. ( $P < 0.05$ )، ( $P < 0.01$ )، ( $P < 0.001$ ) و اختلاف معنی دار را نشان می دهد. N=Nimesulide

بی رنگ باقی مانده و سلولهای مرده رنگ آبی به خود میگیرند. نتایج حاصل از تستهای رفتاری با استفاده از آنالیز آماری ANOVA بررسی شدند.  $P < 0.05$  بعنوان پاسخ معنی دار در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل دادهها توسط تست Tuckey انجام شدند. دادهها بصورت  $\text{Mean} \pm \text{SD}$  بیان شدند. نتایج حاصل از بررسی COXII میزان سنجش رنگ بر اساس دو متغیر توسط نرم افزار Olysia انجام شد که فاکتور Intensity یا شدت رنگ و دیگر، میزان اشباع شدن sensor دوربین می باشد. دادهها بر اساس در صد SD کنترل مقایسه و نتایج با استفاده از آزمون T-test مقایسه شدند.

## یافته ها

نمودار ۱ آستانه تحمل حیوان را نسبت به نیروی وارده توسط تارهای VFF نشان می دهد در گروهی که تحت عمل فشردگی عصب قرار داشتند (CCI saline) از روز سوم کاهش در آستانه تحمل به تارها نسبت به روز کنترل ایجاد شد (که تا روز آخر ادامه داشت. در گروه Sham saline تغییری در هیچیک از روزها مشاهده نشد. در حیواناتی که دارو دریافت نمودند، نیمسولید  $1/25$  میلیگرم/کیلوگرم از روز سوم رفتار درد را به شکل معنی داری ( $P < 0.05$ ) در مقایسه با روز کنترل ایجاد نمود که تا روز آخر ادامه داشت. در حالیکه دوزهای  $2/5$  و  $5$  میلیگرم/کیلوگرم تاثیری در ایجاد آلودینیای مکانیکی نداشتند.



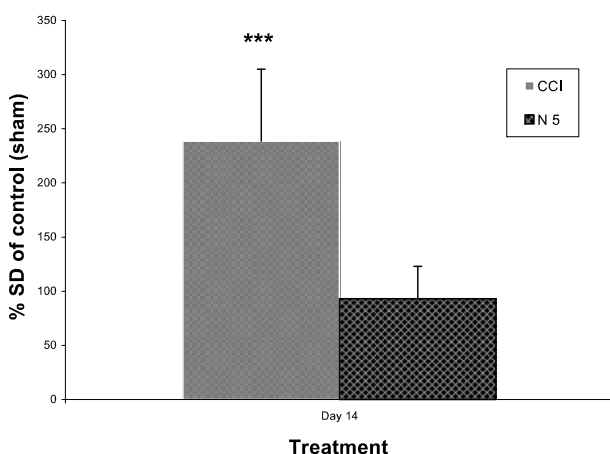
**نمودار ۱- پاسخ به آب  $42^{\circ}\text{C}$  درجه سانتیگراد** در گروههای آزمایشی مختلف تحت تاثیر نیمسولید  $1, 2, 5, 10, 25$  و  $5$  میلیگرم/کیلوگرم طی  $14$  روز بعد از جراحی. ( $P < 0.05$ )، ( $P < 0.01$ )، ( $P < 0.001$ ) و اختلاف معنی دار را نشان می دهد. N=Nimesulide

## بحث

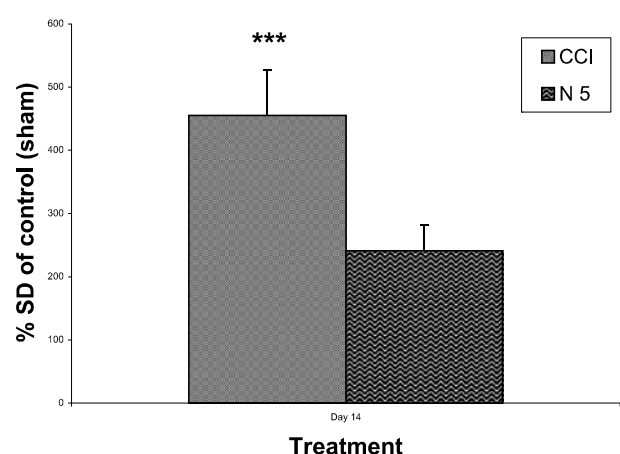
صدمات طناب نخاعی و اعصاب محیطی است. مشخص شده است که به دنبال این صدمات تغییراتی در سطح سلولی خصوصاً سلولهای عصبی و سلولهای ایمنی ایجاد می‌شود (۴۷). سلول‌های ایمنی مرکزی (میکروگلیا) و سلول‌های ایمنی محیطی (ماکروفاژها) در دردهای مزمن و التهابی فعال می‌شوند و عوامل مختلفی از جمله سیتوکین‌های التهابی و پروستاگلندینها را تولید می‌نمایند (۳۸، ۱۵). امروزه در زمینه ایجاد و گسترش دردهای حاد و مزمن توجه بسیاری به نقش سیستم ایمنی در التهابات عصبی شده است (۴۶، ۲۴، ۱۵، ۱۰). به علاوه مشخص شده است که سیتوکین‌ها با تحریک پذیر نمودن اعصاب حسی موجب القای هیپرآلژزیا می‌شود (۴۳).

گزارشات متعدد حاکی از فعال شدن آنزیم COX<sub>II</sub> در شرایط التهاب و درد در اعصاب محیطی می‌باشد (۴۸، ۱۹، ۱۷). پروستاگلندین‌ها در سطح طناب نخاعی در ایجاد درد دخالت دارند (۳۸). تعداد سلول‌های ردیابی کننده COX<sub>II</sub> در ناحیه صدمه عصب به طور چشمگیری افزایش می‌یابد. این مسئله در انسان و موش ثابت شده است (۲۷، ۲۶). افزایش در میزان COX<sub>II</sub> و رسپتور EP در عصب صدمه یافته را مرتبط با درد نوروپاتی می‌دانند (۳۲). بدنبال تحریکات دردزا پروستاگلندین‌ها در محل صدمه و شاخ خلفی نخاع ریلیز می‌شوند که به همراه القا هیپر آلژزیا و آلودینیا می‌باشد. هنگامی که به داخل پوست تزریق شوند موجب هیپرآلژزیا و افزایش اثرات دردزای سایر مدیاتورها می‌گردند (۳۷). مهار کننده‌های

در این تحقیق اثرات ضدالتهابی و آنالژزیک نیمسولید در درد نوروپاتی در سطح سلول‌های ایمنی در موش صحرایی بررسی شد. علت انتخاب مدل فشردگی مزمن عصب (CCI) به دلیل دارا بودن دو بعد التهابی و تروماتیک می‌باشد و گزارش شده است که این مدل حیوانی درد، تقلید کننده دردهای نوروپاتی در انسان می‌باشد (۵). نیمسولید به عنوان یک مهار کننده آنزیم سیکلواکسیژناز با تمایل بسیار زیاد برای مهار COX<sub>II</sub> شناخته شده است. این دارو به طور وسیعی در درمان درد به کار می‌رود (۳۶۶). گزارشات حاکی از تاثیر مناسب نیمسولید در کاهش درد و التهاب ناشی از تجویز فرمالین و عوامل التهاب‌زا در موش صحرایی می‌باشد و در این رابطه نیمسولید اثرات آنتی هیپرآلژزیک مناسب و سریعی ایجاد نموده است. در حالیکه Celecoxib کم اثر و Rofecoxib بی‌تاثیر بوده‌اند (۷). از طرف دیگر نیمسولید در بین داروهای ضد درد و ضد التهاب غیر استروئیدی دارای اثرات جالب و منحصر به فردی می‌باشد. این ترکیب علاوه بر اثرات ضدالتهابی ناشی از مهار PGها، دارای مکانیزم‌های ضدالتهابی متفاوتی نیز می‌باشد (۴). درد نوروپاتی از دردهای شایع بیماران و یک درد مزمن با منشأ محیطی و مرکزی است که به دلایل مختلف ایجاد می‌شود و هنوز درمان قاطعی برای آن مشخص نشده است (۴۶، ۹). مکانیزم‌های مختلفی در ایجاد درد نوروپاتی نقش دارند که مهمترین آنها



**نمودار ۴-** بیان آنزیم سیکلواکسیژناز ۲ در محیط کشت سلول‌های میکروگلیا تحت تاثیر نیمسولید ۵ میلیگرم/کیلوگرم. در گروه‌های آزمایشی مختلف طی ۱۴ اختلاف معنی دار را نشان می‌دهد. (\*\*\*) $P < 0.001$  روز بعد از جراحی در سلول‌های میکروگلیا.



**نمودار ۳-** بیان آنزیم سیکلواکسیژناز ۲ در محیط کشت سلول‌های ماکروفاژ تحت تاثیر نیمسولید ۵ میلیگرم/کیلوگرم. در گروه‌های آزمایشی مختلف طی ۱۴ اختلاف معنی دار را نشان می‌دهد. (\*\*\*) $P < 0.001$  روز بعد از جراحی در سلول‌های میکروگلیا.

نتایج این تجربه بیانگر این واقعیت هستند که هنگامی که بافتی صدمه می‌بیند، درد ایجاد می‌شود، تخریب بافتی و ترمیم آن به همراه واکنش‌های التهابی است و این مسئله موجب فعال شدن رسپتورهای درد گشته و در نتیجه آن ارتباط متقاطعی با عوامل التهابی برقرار می‌شود (۳۱،۲). در این رابطه نقش بسیار مهمی به عهده سلولهای ایمنی محیطی و مرکزی می‌باشد. چون این سلولها مدياتورهای التهابی و فاکتورهای رشد را بیان و آزاد می‌نمایند که مجموعاً در بروز و استمرار درد مزمن شرکت می‌نمایند (۴۵،۲۴،۱۰). سلولهای ایمنی و تنوع مدياتورهای ایمنی را نباید در قالب یک تداخل دینامیک که به دنبال صدمه اعصاب ایجاد می‌شود نادیده گرفت (۴۳). در این رابطه نقش مهم ماکروفاژها و میکروگلیاها مشخص شده است. به این صورت که به محض صدمه عصب از طریق جریان خون، مونوسیت‌های در گردش، به سیستم اعصاب محیطی PNS وارد شده و به ماکروفاژها متمایز گشته و در ناحیه ساکن می‌شوند. ماکروفاژها از عمده ترین منابع تولید پروستاگلاندین‌ها شناخته شده‌اند (۲۰). از عوامل القا کننده تولید PGها، اینترلوکین‌ها می‌باشند که از ماکروفاژها آزاد شده و در تولید مواد دردزا نظیر PGE2 و PGI2 و برادی کینین بعنوان چاشنی عمل می‌نمایند. در این حال PGهای آزاد شده با تحریک پایانه‌های حسی موجب القای هیپرآلژیا در محیط می‌گردند (۲۷). PGها به نوبه خود در محل صدمه موجب آزاد شدن عوامل مختلف نظیر اینترلوکین-۶ می‌گردند. بنابراین یک حلقه فیدبک مثبت را به وجود می‌آورند (۴۴،۴۱،۱۸). در این تحقیق همانطور که در نمودار ۳ مشاهده می‌شود، بیان CoxII در ماکروفاژها در حضور نیمسولید در مقایسه با گروه CCI Saline کاهش معنی داری را نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد ماکروفاژها در گردش خون متأثر از ضایعات و صدمات اعصاب محیطی بوده و در این شرایط مواد دردزا را تولید می‌نمایند (۳۵،۲۰). و نیمسولید احتمالاً با اثرات خاص ضدالتهابی خود و همچنین با مهار CoxII (۴،۳) موجب کاهش بیان این آنزیم در سلولهای ماکروفاژ شده است. گزارش شده است که CoxII در سلولهای ماکروفاژ/میکروگلیا در عصب صدمه یافته انسان بطور بارزی افزایش یافته است. همچنین در مدل CCI در موش صحرائی افزایش بارزی در تعداد سلولهای میکروگلیا به همراه CoxII بعد از صدمه عصب مشاهده شده است. (۱۶).

سیکلوآکسیژناز درد ناشی از این عوامل را مهار نموده‌اند و به نظر می‌رسد این اثرات وابسته به PGها باشد (۱۸). تجربیات ما نیز نشان دادند که نیمسولید (۲/۵ و ۵ میلیگرم/کیلوگرم) رفتار درد نوروپاتیکی را در مدل CCI در حیوان کاهش داد (نمودار ۲،۱) این نتایج تاییدی بر مطالب قبلی می‌باشد. از طرف دیگر ریلیز سیتوکین‌های التهابی به دنبال صدمه بافت یا جراحی، درد موضعی را به وجود می‌آورند. این درد لوکالیزه بعد از صدمه مدتی برقرار می‌ماند که نشان دهنده تولید موادی است که در استمرار درد دخالت می‌کنند (۳۴،۲۳،۱۴). بنابراین درک ارتباط بین سیستم ایمنی و التهاب به جهت ارزیابی درد مزمن از اهمیت خاصی برخوردار است. در تحقیق حاضر اثرات سیستمیک نیمسولید در درد نوروپاتیکی ناشی از صدمه عصب در مدل CCI که دارای بعد التهابی نیز می‌باشد (به دلیل گره ناشی از نخ کرمیک که از عوامل ایجاد کننده التهاب در عصب می‌باشد) بررسی شد. در ارتباط با دخالت سلولهای گلیال در ایجاد درد نوروپاتیکی، در واقع میکروگلیاها احتمالاً مسئول شروع درد هستند و آستروسیت‌ها در حفظ و استمرار آن دخالت دارند (۲۹،۲۲). در مدل التهابی عصب سیاتیک، تجربیات بر این نکته دلالت دارند که فعال شدن میکروگلیاها در ابتدا موجب شروع درد و سپس با فعال کردن آستروسیت‌ها در استمرار و حفظ درد نقش کلیدی و مهمی به عهده دارند (۲۹،۲۵،۲۲). به همین دلیل ممانعت از فعال شدن میکروگلیاها (و در نتیجه جلوگیری از واکنش‌های ناشی از فعال شدن آستروسیت‌ها) قادر به مهار آلودینیا برای مدت طولانی می‌باشد (۲۵). نیمسولید دارای اثرات منحصربه فرد در رابطه با کاهش درد و التهاب می‌باشد (۷،۴) زیرا این ترکیب علاوه بر اثرات ضدالتهابی بعنوان مهار کننده تولید PGها، در کاهش التهاب به طرق دیگر نیز نقش داشته از جمله نیمسولید موجب مهار تولید متابولیت‌های سمی اکسیژن که مرتبط با درد و التهاب هستند در نوتروفیل‌ها می‌گردد (۴۰،۳). همچنین کاهش ریلیز سیتوکین از مکانیزم‌های دیگر نیمسولید است که در این رابطه کاهشی در میزان TNF $\alpha$  که خود در ریلیز سیتوکین‌های هیپر آلژیک دخالت دارد، ایجاد می‌گردد. نکته دیگر در مکانیزم ضد التهابی نیمسولید، تاثیر آن بر رسپتورهای گلوکوکورتیکوئیدی و تغییراتی در بیان ژنهای هدف این عوامل می‌باشد (۳). در بررسی میزان بیان CoxII در سطح سلولی در محیط کشت سلولهای ماکروفاژ و میکروگلیا،



- [6] Bernareggi A, Clinical pharmacokinetics of nimesulide. *Clin Pharmacokinet* 35 (1998) 247-27
- [7] Bianchi M, Broggin M, Anti-hyperalgesic effects of nimesulide: study in rats and humans. *Int J Clin Pract Suppl* 128 (2002) 11-19.
- [8] Boivie J, Hansson P, Lindblom U, Touch, Temperature and Assessment, Progress in Pain Research and Management. *IASP Press Seattle* 1994 325-329.
- [9] Boucher TJ, McMahon SB, Neurotrophic factors and neuropathic pain. *Curr Opin Pharmacol* 1 (1) (2001) 66-72.
- [10] Clatworthy AL, Illich PA, Castro GA, Walters ET, Role of peri-axonal inflammation in the development of thermal hyperalgesia and guarding behavior in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci Lett* 184 (1995) 5-8.
- [11] Colburn RW, Deleo JA, Rickman AJ, Yeager MP, Kwon P, Hickey WF, Dissociation of microglial activation and neuropathic pain behaviors following peripheral nerve injury in the rat. *J Neuroimmunol* 79 (1997) 163-175.
- [12] Colburn RW, Rickman AJ, Deleo JA, The effect of site and type of nerve injury on spinal glial activation and neuropathic pain behavior. *Exp Neurol* 157 (1999) 289-304.
- [13] Coyle DE, Partial Peripheral Nerve Injury Leads to Activation of Astroglia and Microglia Which Parallels the Development of Allodynic Behavior. *Glia* 23 (1998) 75-83.
- [14] Dejongh RF, Vissers KC, Meert TF, Booij LHD, De Deyne CS, Heylen RJ, The role of interleukin-6 in nociception and pain. *Anesth Analg* 96 (2003) 1096-1103.
- [15] Deleo JA, Yezierski RP, The role of neuroimmune activation in persistent pain. *Pain* 90 (2001) 1-6.
- [16] Durrenberger PF, Facer P, Gray RA, Chessell IP, Naylor A, Bountra C, Banati, RB, Birch R, Anand P, Cyclooxygenase-2 (Cox2) in injured human nerve and a rat model of nerve injury. *J Peripher Nerv Syst* 9 (1) (2004) 15-25.
- [17] Edersberg A, Grubb BD, Willingate HL, Gardiner NJ, Nebe J, Schaible HG, The intraspinal release of prostaglandin E2 in a model of acute arthritis is accompanied by up-regulation of cyclooxygenase in the spinal cord. *Neuroscience* 93 (1999) 775-781.
- [18] Hansson PT, Fields HL, Hill RG, Marchettini P, Neuropathic pain: Pathophysiology and Treatment. Progress in Pain Research and Management. *IASP Press Seattle* 21 (2001) 37-62.
- [19] Hay CH, Trevethick MA, Wheeldon A, Bowers JS, de Belleruche JS, The potential role of spinal cord cyclooxygenase-2 in the development of Freund's

آزمایشات ما کاهش در بیان CoxII در سلول‌های میکروگلیا نشان داد (نمودار ۴). شواهد زیادی دلالت بر بیان CoxII در سلول‌های شوآن و همچنین ماکروفاژها به دنبال صدمه سیاتیک در موش صحرائی دارند (۲۷). به نظر می‌رسد بیان CoxII بعد از صدمه در اعصاب محیطی دو مرحله‌ای باشد، اگرچه قبلاً گزارش شده که ۲ تا ۴ هفته بعد از صدمه عصب بیان CoxII افزایش می‌یابد ولی تحقیقات دیگر، افزایشی در بیان CoxII در مراحل ابتدایی (۱ تا ۳) روز بعد از صدمه عصب را نشان داده‌اند (۲۷) و این افزایش را در ارتباط با بروز درد نوروپاتیک مطرح نموده‌اند. همچنین در مدل‌های مختلف ایجاد درد نوروپاتیک، سلول‌های ایمنورآکتیو برای CoxII بیشتر ماکروفاژهایی هستند که به محل صدمه عصب کشیده شده‌اند (۲۶). از طرف دیگر، میکروگلیاهای طناب نخاعی از مهمترین عوامل دخیل در ایجاد و استمرار درد شناخته شده‌اند (۱۲، ۱۳، ۴۰). بنابراین با توجه به درگیری سیستم ایمنی در هنگام صدمه و ایجاد التهاب و با توجه به نقش موثر پروستاگلاندین‌ها در ایجاد هیپرآلژزیا، و همانطور که نتایج این تحقیق بر روی سلول‌های ماکروفاژ و میکروگلیا نشان داد، به نظر می‌رسد ترکیباتی نظیر داروهای مهارکننده‌های CoxII به خصوص نيمسولید، که دارای اثرات ویژه‌ای نیز می‌باشد (۴، ۴۰)، با تاثیر بر سلول‌های ایمنی احتمالاً تأثیرات مناسبی در زمینه تسکین دردهای نوروپاتیک داشته باشند.

## منابع

- [1] Ard MD, Cole GM, Wei J, Mehrle AP, Fratkin JD, Scavenging of Alzheimer's  $\beta$  Amyloid-Protein by Microglia in Culture. *J Neurosci Res* 43 (1996) 190-202.
- [2] Bartfai T, Immunology: Telling the brain about pain. *Nature* 410 (2001) 425-427.
- [3] Bennett A, Overview of nimesulide. *Rheumatology* 38 (1999) 11-19.
- [4] Bennett A, Villa G, Nimesulide: an NSAID that preferentially inhibits Cox-2 and has various unique pharmacological activities. *Expert Opin Pharmacother* 1(2) (2000) 277-8.
- [5] Bennett GJ, Xie YKA, Peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in men. *Pain* 33(1988) 87-107.

- T, Microglial proliferation in the spinal cord of aged rats with a sciatic nerve injury. *Neurosci Lett* 287 (2) (2000) 121-124.
- [34] Sweitzer SM, Martin D, Deleo JA, Intrathecal interleukin-1 receptor antagonist in combination with soluble tumor necrosis factor receptor exhibits an anti-allodynic action in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience* 103 (2001) 529-539.
- [35] Takahashi M, Kawaguchi M, Shimada K, Konishi N, Furuya H, Nakashima T, Cyclooxygenase-2 expression in Schwann cells and macrophages in the sciatic nerve after spinal nerve injury in rats. *Neurosci Lett* 363 (2004) 203-206.
- [36] Tassorelli C, Greco R, Sandrini G, Nappi G, Central components of the analgesic/antihyperalgesic effect of nimesulide: studies in animal models of pain and hyperalgesia. *Drugs* 63 (2003) 9-22.
- [37] Tegeder I, Niederberger E, Vetter G, Brantigam L, Geisslinger G, Effects of selective Cox1 and Cox2 inhibitors on formalin-evoked nociceptive behaviour and prostaglandin E2 release in the spinal cord. *J Neurochem* 79 (4) (2001) 777-86.
- [38] Vanegas H, Schaible HG, Prostaglandins and cyclooxygenase in the spinal cord. *Prog Neurobiol* 64 (2001) 327-63.
- [39] Wall PD, Devor M, Inbal R, Scadding JW, Schonfeld D, Seltzer Z, Tomkiewicz MM, Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anesthesia dolorosa. *Pain* (7) (1979) 103-113.
- [40] Ward A, Brogden RN, Nimesulide: A preliminary review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in inflammation and pain states. *Drugs* 36 (1988) 732-753.
- [41] Watkins LR, Maier SF, Glia: A novel drug, discovery target for clinical pain. *Nature Rev* 2 (2003) 973-985.
- [42] Watkins LR, Maier SF, Beyond neurons: Evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. *Physiol Rev* 82 (2002) 981-1011.
- [43] Watkins LR, Maier SF, Goehler LE, Immune activation: the role of proinflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. *Pain* 63 (1995) 289-302.
- [44] Watkins LR, Maier SF, Implications of immune-to-brain communication for sickness and pain. *Proc Natl Acad Sci* 96 (14) (1999) 7710-7713.
- complete adjuvant-induced changes in hyperalgesia and allodynia. *Neuroscience* 78 (1997) 843-850.
- [20] Kiefer R, Kieseier BC, Stoll G, Hartung HP, The role of macrophage in immune-mediated damage to the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol* 64 (2001) 109-127.
- [21] Kim SH, Chung JM, An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50 (1992) 355-363.
- [22] Kreutzberg GW, Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19 (1996) 312-318.
- [23] Lacroix S, Chang L, Rose-John S, Tuzynski MH, Delivery of hyper-interleukin-6 to the injured spinal cord increases neutrophil and macrophage infiltration and inhibits axonal growth. *J Comp Neurol* 454 (2002) 213-228.
- [24] Laughlin TM, Bethea JR, Yeziarski RP, Wilcox GL, Involvement of proinflammatory cytokine IL-1 $\beta$  in dynorphin-induced allodynia. *Pain* 84 (2000) 159-167.
- [25] Ledboer A, Slone EM, Milligan ED, Matthew GF, Manony JH, Maier SE, Watkins LR, Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. *Pain* 115 (2005) 71-83.
- [26] Ma W, Eisenach JC, Cyclooxygenase 2 in infiltrating inflammatory cells in injured nerve is universally up-regulated following various types of peripheral nerve injury. *Neuroscience* 121(2003b) 691-704.
- [27] Ma W, Eisenach JC, Morphological and pharmacological evidence for the role of peripheral prostaglandins in the pathogenesis of neuropathic pain. *Eur J Neurosci* 15 (2002) 1037-1047.
- [28] Mandez-Borran R, Vetvicka V, editors. *Cellular Immunology*. 2nd ed. *CRC Publication*. 2001, p. 12-21.
- [29] Marchand F, Perretti M, McMahon SB, Role of the immune system in chronic pain. *Nature Rev* 6 (2005) 521-532.
- [30] Moalem G, Tracey DJ, Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Research Rev* 51(2006) 240-264.
- [31] Rittner HL, Brack A, Stein C, Pain and the immune system: friend or foe? *Anesthesist* 51 (2002) 351-358.
- [32] Seltzer Z, Dubner R, Shir YA, Novel behavioral model of neuropathic pain disorders in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43 (1990) 205-218.
- [33] Stuesse SL, Cruce WL, Lovell JA, McBurney DL, Grisp

- 117-132.
- [48] Zhao Z, Chen SR, Eisenach JC, Busija DW, Pan HL, Spinal cyclooxygenase-2 is involved in development of allodynia after nerve injury in rats. *Neuroscience* 97 (4) (2000) 743-8.
- [49] Zimmermann M, Pathobiology of pain. *Eur J Pharmacol* 429 (2001) 23-27.
- [50] Zimmermann M, Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16 (1983) 109-110.
- [45] Woolf CJ, Allchome A, Safieh-Garabedian B, Poole S, Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Br J Pharmacol* 121 (1997) 417-424.
- [46] Woolf CJ, Mannion RJ, Neuropathic pain: etiology, symptoms, mechanisms, and management. *The Lancet* 353 (1999) 1959-1964.
- [47] Yeziarski RP, Burchiel KJ, Spinal Cord Injury Pain: Assessment, Mechanisms, Management. Progress in Pain Research and Management. *IASP Press Seattle* 23 (2001)