



Effect of glial inhibition in attenuation of neuropathic pain and improvement of morphine analgesic effect in a rat model of neuropathy

Samad Nazemi¹, Homa Manaheji^{1,2*}, Abbas Haghpars², Jalal Zaringhalam^{1,2}, Mehdi Sadeghi¹

1. Dept. Physiology, Shahid Beheshti Medical Sciences University, Tehran, Iran

2. Neuroscience Research Center, Shahid Beheshti Medical Sciences University, Tehran, Iran

Received: 13 Nov 2011

Accepted: 5 Jan 2012

Abstract

Introduction: Pharmacological blockage of glial activity has been proved useful for treatment of neuropathic pain by lowering proinflammatory cytokines. The present study is to confirm the effect of post-injury administration of pentoxifylline on chronic constriction injury (CCI)-induced neuropathic pain symptoms_ and improved the efficacy of morphine anti-nociception.

Methods: Male Wistar rats (230-270 g) underwent surgery for induction of CCI model of neuropathy. In the sham group the nerve was exposed but not ligated. In 5 groups (n=8) morphine (2.5, 5, 7.5, 10, 15 mg/kg s.c.) was administered in post-operative days (POD) 0, 6 and 14. To evaluate the analgesic effect of different doses of morphine, Von Frey and Hargreaves tests were performed before and 30 minutes after morphine administration. In different groups, pentoxifylline (8, 15, 30 mg/kg i.p.) or normal saline (vehicle) were administered from POD6 to POD13. Behavioral tests were utilized after last dose of pentoxifylline and also on POD14 again after injection of a single dose of morphine (5 mg/kg, s.c.).

Results: The analgesic effect of morphine (5 mg/kg) on POD6 and morphine (5, 7.5, 10, 15 mg/kg) on POD14 was significantly decreased in comparison to POD0. Pentoxifylline effectively attenuated thermal hyperalgesia (at 15 and 30 mg/kg) and mechanical allodynia (at 30 mg/kg) on POD13. However, pentoxifylline (15, 30 mg/kg) improved the anti-hyperalgesic effect of morphine (5 mg/kg s.c.) on POD14.

Conclusion: Analgesic effect of morphine was reduced after nerve injury and it may be due to the activation of glia. Inhibition of glial activity is an effective way to attenuate CCI-induced neuropathic pain and also to improve the anti-hyperalgesic effect of morphine, without significant effect on its anti-allodynic effect.

Key words: Neuropathic pain, Glia, Morphine, Allodynia, Hyperalgesia

* Corresponding author e-mail: hshardimanaheji@yahoo.com
Available online at: www.phypha.ir/ppj

اثر مهار سلول‌های گلیا بر بهبود درد نوروپاتی و افزایش اثر ضد دردی مورفین در یک مدل نوروپاتی در موش صحرایی

سمد ناظمی^۱، هما مناهجی^{۲*}، عباس حق پرست^۲، جلال زرین قلم^{۲،۱}، مهدی صادقی^۱

۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

۲. مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

پذیرش: ۱۵ دی ۹۰

دریافت: ۲۲ آبان ۹۰

چکیده

مقدمه: دردهای نوروپاتی از مشکل‌ترین موارد درمان هستند. مهار فعالیت سلول‌های گلیا با ترکیبات دارویی مناسب با کاهش بیان سیتوکین‌های پیش‌التهابی موجب بهبود دردهای نوروپاتی می‌شود. در مطالعه حاضر اثر تجویز داخل صفاقی پنتوکسی‌فیلین بر علائم درد نوروپاتی ناشی از بستن عصب سیاتیک و بهبود اثر ضددردی مورفین مورد بررسی قرار گرفته است.

روش‌ها: موش‌های صحرایی نر ویستار (۲۷۰-۲۳۰ گرم) برای ایجاد مدل نوروپاتی بستن مزمن عصب سیاتیک تحت عمل جراحی قرار گرفتند. در گروه شم عصب باز شد ولی گره زده نشد. در ۵ گروه (n=۸) مورفین (۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ mg/kg s.c.) در روز صفر و روزهای ۶ و ۱۴ بعد از جراحی تزریق شد، به منظور بررسی اثر ضد دردی دوزهای مختلف مورفین تست‌های رفتاری هارگریوز و فون‌فری قبل و ۳۰ دقیقه بعد از هر نوبت تزریق مورفین انجام گرفت. در گروه‌های جداگانه، پنتوکسی‌فیلین (۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰ mg/kg i.p.) و نرمال سالین (حامل) از روز ششم تا ۱۳ بعد از جراحی تزریق گردید، پس از تزریق آخرین دوز پنتوکسی‌فیلین تست‌های رفتاری انجام گرفت، در روز ۱۴ بعد از جراحی مورفین (۵ mg/kg s.c.) تزریق و تست‌های رفتاری بعمل آمد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد اثر ضد دردی مورفین (۵ mg/kg) در روز ۶ و مورفین (۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۵ mg/kg) در روز ۱۴ پس از بستن عصب سیاتیک نسبت به روز صفر کاهش معنی‌دار داشته است. پنتوکسی‌فیلین (۱۵، ۳۰ mg/kg) موجب کاهش هیپرالژزیای حرارتی و (۳۰ mg/kg) موجب کاهش آلودینیای مکانیکی در روز ۱۳ بعد از جراحی و همچنین پنتوکسی‌فیلین (۱۵، ۳۰ mg/kg) موجب بهبود اثر ضد هیپرالژزیای مورفین (۵ mg/kg) در روز ۱۴ بعد از جراحی گردیده است در حالی که بر اثر ضد آلودینیای مورفین اثری نداشته است.

نتیجه‌گیری: بدنال ایجاد ضایعات عصبی اثر ضد دردی مورفین کاهش می‌یابد. این اثر می‌تواند ناشی از فعال شدن سلول‌های گلیا باشد زیرا مهار فعالیت سلول‌های گلیا پس از ایجاد آسیب عصبی توانسته است دردهای نوروپاتی را کاهش داده و اثر ضد هیپرالژزیای مورفین را که در این شرایط کاهش یافته بهبود بخشد هر چند که بر اثر ضد آلودینیای مورفین تأثیر معنی‌داری نداشته است.

واژه‌های کلیدی: درد نوروپاتی، سلول‌های گلیا، مورفین، آلودینیا، هیپرالژزیای

مقدمه

سیستم عصبی محیطی یا مرکزی در اثر عواملی از قبیل، ضربه، التهاب، هیپوکسی و بیماری‌هایی مانند دیابت، سرطان، MS، AIDS، هرپس و... بوجود می‌آید و معمولاً با علائمی از قبیل هیپرالژزی و آلودینیا همراه است [۸، ۴۱]. این دردها از مشکل‌ترین موارد درمان در کلینیک هستند و میلیون‌ها نفر در سراسر دنیا از این نوع دردها رنج می‌برند. ضد افسردگی‌های

درد نوروپاتی نوعی درد مزمن است که بدنال آسیب

* نویسنده مسئول مکاتبات: hshardimanaheji@yahoo.com
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

سه حلقوی و گاباپنتین داروهای رایج و در دسترس کلینیکی برای دردهای نوروپاتی می باشند ولی در بسیاری از موارد کارایی مطلوبی ندارند [۴۰]. از طرف دیگر به علت ایجاد تحمل به اثرات ضد دردی مورفین در شرایط نوروپاتی، دوزهای متداول اپیوئیدها کارایی خود را از دست داده و باید از دوزهای بالاتر استفاده نمود که معمولاً به علت بروز اثرات جانبی، رسیدن به یک دوز درمانی موثر با شکست مواجه می شود [۵].

تلاش زیادی برای شناسایی مکانیسم های دخیل در ایجاد دردهای نوروپاتی صورت گرفته است. یافته های اخیر نوروها و سلول های گلیا را در بروز دردهای نوروپاتی دخیل دانسته اند. مکانیسم های نورونی بیان می کنند درد نوروپاتی در نتیجه ایجاد تغییرات پلاستیستی طولانی مدت در مسیرهای انتقال حس درد در نخاع و مغز ایجاد می شود [۴۰]. این تئوری ها پیشنهاد می کنند بدنال آسیب ها و بیماری های عصبی واسطه های زیادی از قبیل ATP، پروستاگلندین ها، ماده P، گلوتامات و NO در محیط پیرامون نوروها در مغز و نخاع آزاد شده و با ایجاد تغییرات پایدار در فعالیت های سیناپسی نوروها مسیر درد، موجب بروز علائم دردهای نوروپاتی می شوند [۲۹]. علاوه بر این شواهد پیشنهاد می کند که فعال شدن مکانیسم های عصبی-ایمنی در سیستم عصبی مرکزی همراه با فعال شدن سلول های گلیا نقش مهمی در ایجاد پلاستیستی سیناپسی و حساس شدن نورونی و بروز دردهای نوروپاتی و پدیده تحمل به مورفین ایفا می کنند [۱۱، ۳۱، ۳۲، ۳۶، ۳۷]. این تئوری ها نشان داده اند که فعال شدن سلول های گلیا در نخاع و بدنال آن تولید سیتوکین ها و کموکین های مختلف می تواند فعالیت سیناپسی را به صورت پایدار تغییر داده و موجب ایجاد دردهای نوروپاتی شود. نقش سلول های ایمنی در ایجاد درد نوروپاتی اولین بار در سال ۱۹۹۳ عنوان شد. از طرف دیگر عواملی که موجب ایجاد هایپرآلژیا می شوند، غالباً سلول های ایمنی را در سیستم عصبی مرکزی و محیطی نیز فعال می کنند [۳۵]. در شرایط طبیعی میکروگلیاها به عنوان سلول های ناظر سیستم ایمنی در CNS عمل می کنند. میکروگلیاها دارای سنسورهای بسیار دقیقی برای کشف تغییرات کوچک محیط اطراف خودشان هستند. محرک های مختلفی از قبیل آسیب، التهاب، عفونت، ایسکمی و دژنراسیون عصبی می تواند موجب فعال شدن میکروگلیاها شود [۲۵]. با توجه به این شواهد به نظر

می رسد که میکروگلیاها مسئول آغاز روند نوروپاتی و پایدار شدن آن هستند. از طرف دیگر نقش گلیاها در تنظیم اثر اپیوئیدها موضوع جدیدی است که در طول ده سال گذشته مطرح شده است. تحقیقات نشان داده فعال شدن گلیاها در بروز پدیده تحمل به مورفین نیز نقش دارد به نحوی که جلوگیری از فعال شدن گلیاها بروز پدیده تحمل به مورفین را به تاخیر می اندازد. بدنال تزریق مزمن داخل صفاقی مورفین در موش، سطح GFAP (مارکر فعال شدن سلول های آستروسیت) در نخاع، کورتکس سینگولا و هیپوکمپ افزایش می یابد، زمانی که جلوی رشد و فعالیت آستروسیت ها بوسیله فلونوروسیترات که یک داروی مهار کننده فعالیت های متابولیکی آستروسیت است گرفته می شود، بخشی از قدرت ضد دردی مورفین برمی گردد [۲۷]. اولین بار Mayer در سال ۱۹۹۹ بیان کرد که احتمالاً مکانیسم سلولی و ملکولی ایجاد درد نوروپاتی و بروز پدیده تحمل به مورفین مشابه یکدیگر هستند [۱۶]. این یافته ها از این نظر قابل توجه هستند که به وسیله آن می توان توضیح داد که چرا استفاده از اپیوئیدها برای درمان دردهای حاد موثرتر است، در حالی که دردهای مزمن و نوروپاتی ها به اپیوئیدها پاسخ مناسبی نشان نمی دهند و باید از دوزهای بالاتر مورفین برای کنترل این گونه دردها استفاده کرد.

همانگونه که اشاره شد بدنال آسیب عصبی گلیاها فعال شده و با آزاد کردن سیتوکین های پیش التهابی و سایر ترکیبات تحرکی موجب تسهیل انتقال درد و ایجاد درد نوروپاتی می شوند. بنابراین مهار فعال شدن سلول های گلیا با استفاده از ترکیبات دارویی مناسب می تواند به عنوان یک دیدگاه جدید برای کنترل و درمان دردهای نوروپاتی مورد توجه قرار گیرد [۷، ۱۴، ۲۲، ۲۴]. پروپنتوفیلین، پنتوکسیفیلین، مینوسیکلین و ایبودیلات از مهمترین ترکیباتی هستند که با مهار فعال شدن گلیاها و جلوگیری از تولید سیتوکین ها موجب مهار روند ایجاد درد نوروپاتی می شوند [۱۹، ۲۸].

در این مطالعه هدف ما بررسی پروفایل زمانی کاهش اثر ضد دردی مورفین بدنال ایجاد آسیب عصبی و همچنین بررسی نقش سلول های گلیا در ایجاد و پایدار شدن دردهای نوروپاتی بوده است. در اغلب مطالعات انجام شده پیش درمانی^۱

1. Preemptive

با داروهای مهارکننده گلیا جهت کاهش عوارض دردهای نوروپاتی مورد توجه بوده در حالی که در شرایط عادی معمولاً بندرت فرصت استفاده از این داروها پیش از بروز آسیب عصبی وجود دارد. در این پژوهش تغییرات اثر ضد دردی مورفین بدنبال ایجاد درد نوروپاتی و همچنین اثر تجویز داروهای مهار کننده فعال شدن گلیاها پس از ایجاد درد نوروپاتی بر بهبود درد نوروپاتی و افزایش اثر ضد دردی مورفین مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

حیوانات آزمایشگاهی: در این آزمایش موش‌های صحرایی نر Wistar با وزن ۱۸۰ - ۲۳۰ گرم استفاده شد. حیوانات در شرایط یکسان رطوبت، دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد و ۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی با دسترسی راحت به آب و غذای استاندارد و کافی از یک هفته قبل از آزمایش نگهداری شدند. حیوانات در گروه‌های ۸ تایی قرار گرفتند، حیوانات گروه آزمایشی جهت ایجاد مدل نوروپاتی تحت عمل جراحی CCI (Chronic constriction injury) [۲] قرار گرفتند. در گروه شاهد (sham operation) پوست و عضله ران برش داده شد و پس از نمایان شدن عصب سیاتیک بدون دستکاری بخیه زده شد. تمامی آزمایش‌ها منطبق با دستورالعمل مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی (موسسه ملی بهداشت آمریکا، شماره نشر ۲۳-۸۰، تجدید نظر ۱۹۹۶) رعایت شده و کلیه روش‌ها مورد تایید کمیته اخلاق تحقیق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی بوده است. در این پژوهش از مدل نوروپاتی CCI (Bennett & Xie 1988) استفاده شد [۲]. به طور خلاصه ابتدا موش‌ها با تزریق داخل صفاقی مخلوط کتامین و زایلازین ($60/10 \text{ mg/Kg}$) بیهوش شدند. سپس پای سمت راست در همه حیوانات اصلاح شده و با ایجاد یک شکاف در عضله دو سر ران دسترسی به عصب سیاتیک فراهم شد، عصب سیاتیک با دقت از بافت‌های همبند اطراف جدا گردید، دور عصب سیاتیک قبل از محل سه شاخه شدن، چهار گره شل بوسیله نخ بخیه کرومیک گات ۴-۰ به فاصله تقریبی یک میلی‌متر قرار گرفت. فشار گره‌ها به قدری اعمال می‌شد که یکسری انقباضات خفیف در عضلات اطراف محل جراحی شده مشاهده

شود و جریان خون در زیر غلاف پرینوریون نیز قطع نگردد. سپس عصب سیاتیک در محل خود قرار می‌گرفت، عضلات و پوست بطور جداگانه بخیه شدند، زخم حیوانات ضد عفونی شده و در قفس‌های تمیز قرار گرفتند. حیوانات بعد از عمل به صورت تصادفی به گروه‌های آزمایشی مختلف تقسیم شدند ($n=8$). ۱- گروه نوروپاتی، و شاهد ۲- گروه‌هایی که دوزهای مختلف مورفین ($2.5, 5, 7.5, 10, 15$) در روز قبل از جراحی و روزهای ۶ و ۱۴ بعد از جراحی دریافت کردند ۳- گروه‌هایی که از روز ۶ پس از جراحی دوزهای مختلف پنتوکسی‌فیلین ($8, 15, 30 \text{ mg/kg i.p.}$) به مدت ۸ روز متوالی دریافت کردند. تجویز دارو به این شکل بود که مورفین سولفات (Iran, Temad) در نرمال سالین حل شد و به صورت زیر پوستی تزریق شد. پنتوکسی‌فیلین (Sigma-Aldrich, Germany) در نرمال سالین حل شد و به صورت داخل صفاقی تزریق شد. گروه شاهد با الگوی مشابهی حجم برابری از نرمال سالین را دریافت کردند.

به منظور ارزیابی وضعیت تغییرات رفتاری طی روند نوروپاتی، تغییر در اثر ضد دردی مورفین و اثر داروهای مورد نظر در بهبود اثر مورفین، تست‌های رفتاری آلودینیای مکانیکی و هیپرآلژزیای حرارتی انجام شد. در گروه نوروپاتی و شاهد تست‌های رفتاری در روزهای صفر، ۲، ۶، ۱۰ و ۱۴ بعد از عمل جراحی انجام گرفت. در گروه‌هایی که دوزهای مختلف مورفین دریافت کرده بودند، تست‌های رفتاری در روزهای تزریق مورفین (روزهای ۰، ۶ و ۱۴ بعد از جراحی) و در دو مرحله ابتدا قبل از تزریق و سپس ۳۰ تا ۶۰ دقیقه بعد از تزریق انجام می‌گرفت. در گروه‌هایی که پنتوکسی‌فیلین دریافت کردند تست‌های رفتاری پس از تزریق آخرین دوز پنتوکسی‌فیلین در روز ۱۳ بعد از جراحی انجام گرفت و سپس روز بعد (روز ۱۴ بعد از جراحی) یک تک دوز مورفین (5 mg/kg) تزریق شد و مجدداً تست‌های رفتاری بعمل آمد.

به منظور ارزیابی آلودینیای مکانیکی (تست رفتاری فون فری)، موش‌ها روی یک صفحه مشبک فلزی ($5 \times 5 \text{ cm}$) و درون محفظه پلاستیکی ($40 \times 30 \times 30 \text{ cm}$) قرار می‌گرفتند. بعد از گذشت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه که حیوان با محیط عادت کرد، تارهای فون فری با درجات مختلف ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۵، ۲۶ و ۶۰ گرمی (wood dale, IL, Stoelting) به

دوزهای مختلف مورفین انجام گرفته بود به صورت درصد حداکثر پاسخ بی‌دردی (MPE%) به روش Kiel (۱۹۹۵) محاسبه گردید و با استفاده از آنالیز واریانس دو طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت [۱۳].

$$\text{MPE\%} = \frac{\text{پاسخ قبل دارو} - \text{پاسخ بعد دارو}}{\text{پاسخ قبل دارو} - \text{Cut off}}$$

یافته ها

نتایج حاصل از تست هارگریوز در روزهای ۲، ۶، ۱۰ و ۱۴ بعد از جراحی نشان داد مدت زمان تاخیر در عقب کشیدن پای نوروپاتی شده حیوانات از محرک حرارتی دردناک نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌دار داشته است ($P < 0.001$) که نشان دهنده بروز هایپرالژزیای حرارتی می‌باشد (شکل ۱). همچنین نتایج حاصل از تست فون‌فری در روزهای ۲، ۶، ۱۰ و ۱۴ بعد از جراحی نشان داد آستانه تحمل حیوانات برای محرک مکانیکی غیر دردناک نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌دار داشته است ($P < 0.001$) که حاکی از بروز آلودینیای مکانیکی در پای نوروپاتی شده حیوان می‌باشد (شکل ۲).

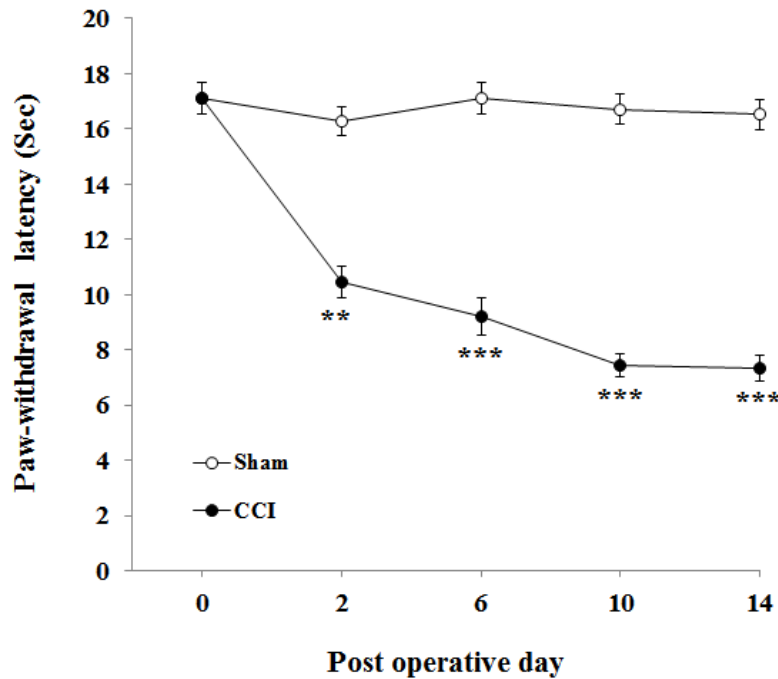
آنالیز نتایج تست هارگریوز برای بررسی اثر ضد دردی دوزهای مختلف مورفین بر هایپرالژزیای حرارتی نشان داد بستن عصب سیاتیک موجب کاهش اثر ضد دردی مورفین شده است [$F(2, 84) = 11.92$, $P < 0.001$]. شکل ۳ نشان می‌دهد که در روز ۶ بعد از جراحی فقط پاسخ دوز ۵ میلی‌گرم مورفین در مقایسه با روز قبل از عمل کاهش معنی‌داری داشته است ($P < 0.001$). در حالی که در روز ۱۴ بعد از عمل پاسخ همه دوزها به جز دوز ۲/۵ نسبت به روز قبل از جراحی کاهش معنی‌داری نشان داد ($P < 0.001$). آنالیز نتایج تست فون‌فری برای بررسی آلودینیای مکانیکی نشان داد بستن عصب سیاتیک به مرور زمان موجب کاهش اثر بی‌دردی مورفین شده است [$F(2, 84) = 5.93$, $P < 0.001$]. شکل ۴ نشان می‌دهد که پاسخ‌ها در روز ۶ بعد از عمل در مقایسه با روز قبل از جراحی کاهش معنی‌داری نداشته است ($P > 0.05$), در روز ۱۴ بعد از جراحی فقط پاسخ دوز ۵ میلی‌گرم مورفین در مقایسه با روز قبل از عمل کاهش معنی‌داری نشان داد ($P < 0.05$).

به منظور بررسی اثر مهار فعالیت سلول‌های گلیا بر

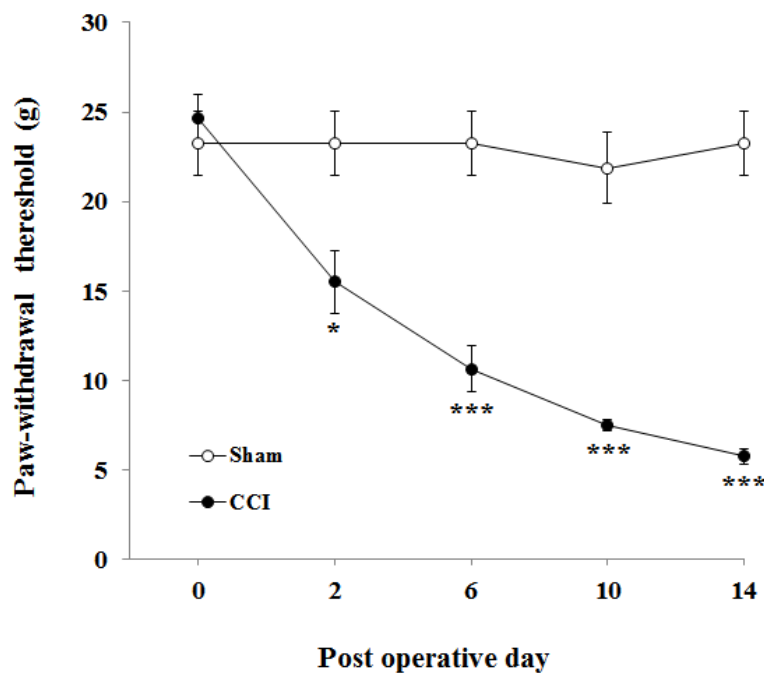
روش بالا-پایین Dixon (Up-Down method) به کف پای حیوان اعمال می‌شد [۴]. بدین ترتیب که ابتدا از تار ۸g که در وسط سری تارها قرار داشت شروع می‌کردیم، تار را به مدت ۵ ثانیه به کف پای حیوان اعمال می‌کردیم، به اندازه‌ای که تار کمی خم شود. اگر پاسخ منفی بود در سری بعدی تاری با نیروی بالاتر و اگر مثبت بود از تاری با نیروی پایین‌تر استفاده می‌شد، تار ۶۰g به عنوان Cut off در نظر گرفته شد، فاصله بین تحریکات ۵ دقیقه بود. پاسخ‌هایی که در اثر حرکت و سایر رفتارهای طبیعی حیوان بود در نظر گرفته نشد. کمترین شدت محرک بر حسب گرم که می‌توانست ۳ پاسخ مثبت را از مجموع ۵ بار اعمال تحریک ایجاد کند به عنوان آستانه تحمل حیوان برای محرک مکانیکی غیر دردناک در نظر گرفته می‌شد.

همچنین به منظور ارزیابی هایپرالژزیای حرارتی (تست رفتاری هارگریوز)، تغییرات هایپرالژزیای حرارتی طی روند پیشرفت نوروپاتی با استفاده از دستگاه Radiant heat Ugo Basil (Italy) مورد بررسی قرار گرفت. حیوانات درون محفظه‌های مخصوص دستگاه قرار می‌گرفتند، بعد از گذشت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه که حیوان به محیط جدید عادت کرد محرک حرارتی با شدت ثابت به ناحیه کف پای حیوانات اعمال شد. مدت زمان تحمل در برابر تابش اشعه گرمایی بیانگر آستانه تحمل درد حیوان می‌باشد که بر حسب ثانیه ثبت می‌گردید، زمان ۳۳ ثانیه به عنوان Cut off در نظر گرفته شد. پاسخ‌هایی که در اثر حرکت کردن و سایر رفتارهای طبیعی حیوان باشد در نظر گرفته نمی‌شد. اینکار ۳ بار با فواصل زمانی حداقل ۵ دقیقه برای هر پا انجام می‌گرفت [۲۹].

در این پژوهش پاسخ هر دو پای حیوان ثبت می‌شد و به خاطر اینکه بدنبال CCI در پای سمت مقابل نیز مقداری حساسیت ایجاد می‌شود، اطلاعات هر اندام به طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بر اساس میانگین و خطای استاندارد در نظر گرفته شد. نتایج هایپرالژزیای با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه یا دوطرفه و تست تعقیبی Bonferroni و نتایج آلودینیای با استفاده از تست‌های غیرپارامتری من‌ویتنی و کروس‌کالوالیس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. p کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌دار بودن در نظر گرفته شد. نتایج گروه‌های مختلف مورفین که در دو نوبت قبل و بعد از تزریق



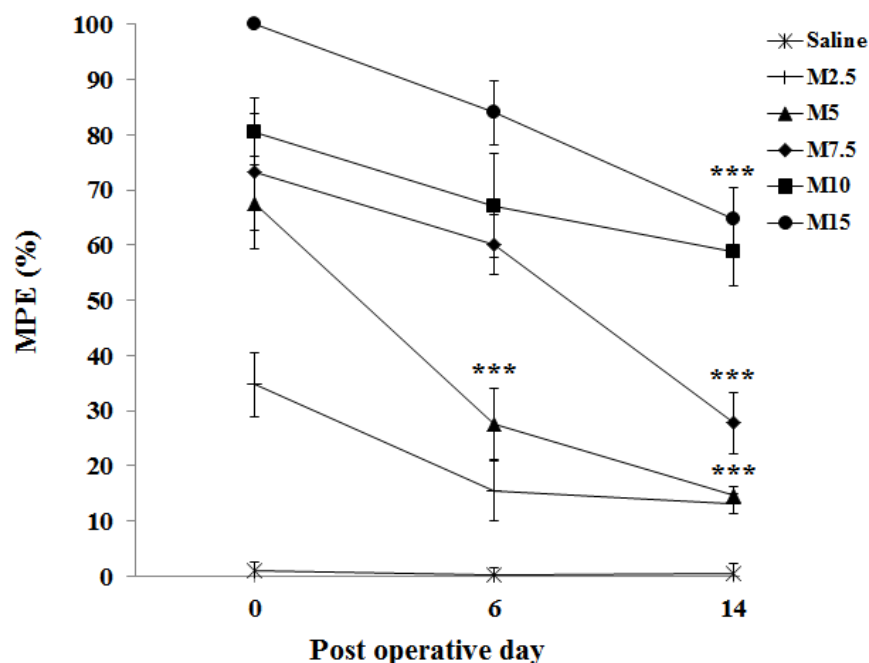
شکل ۱- نتایج حاصل از تست هارگریوز، تغییر در زمان عقب کشیدن پا از محرک حرارتی دردناک (هایپرآلژزیای حرارتی قبل از CCI و روزهای ۲، ۶، ۱۰ و ۱۴ بعد از CCI (n=8). * تفاوت معنی دار نسبت به گروه شاهد (**P<0.01, ***P<0.001).



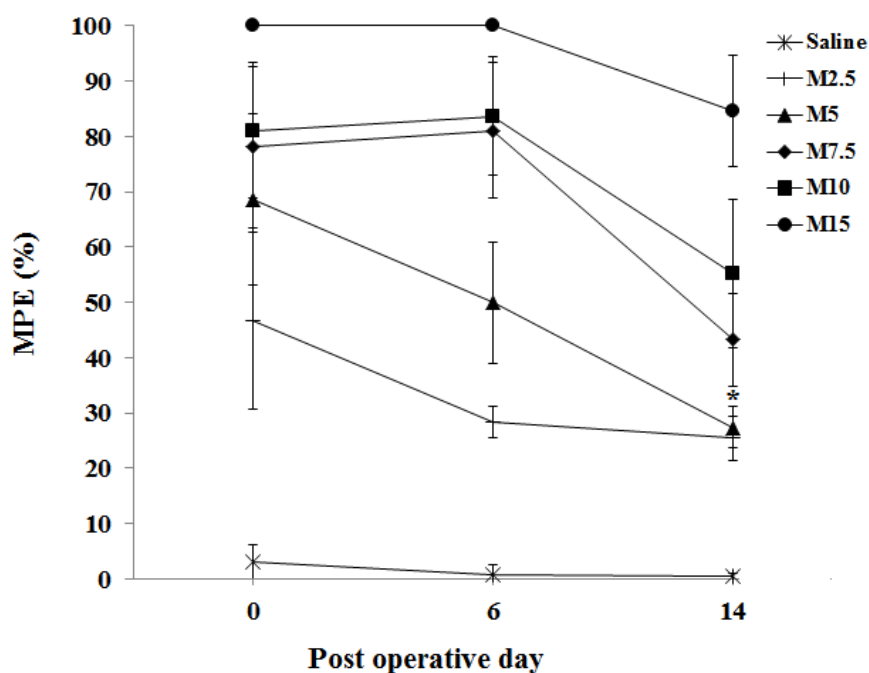
شکل ۲- نتایج حاصل از تست فونفری، تغییر در آستانه عقب کشیدن پا از محرک مکانیکی غیر دردناک (آلودینیای مکانیکی) قبل از CCI و روزهای ۲، ۶، ۱۰ و ۱۴ بعد از CCI (n=8). * تفاوت معنی دار نسبت به گروه شاهد (*P<0.05, ***P<0.001).

گروه‌ها نشان داد [F(3,28)=18.29, p<0.0001]. بطوریکه مدت زمان عقب کشیدن پای حیوان از محرک حرارتی در گروه پنتوکسی‌فیلین ۳۰ میلی گرم (p=۰/۰۰۰۱, ۱۴/۳±۰/۹) و ۱۵ میلی گرم (p=۰/۰۰۱, ۱۲/۶±۰/۶۵) افزایش معنی داری در

هایپرآلژزیای ایجاد شده، از روز ۶ بعد از عمل تا روز ۱۳ به مدت ۸ روز پنتوکسی‌فیلین (۸mg/kg، ۱۵، ۳۰) به روش داخل صفاقی تزریق شد. آنالیز واریانس یکطرفه نتایج تفاوت معنی داری را بین



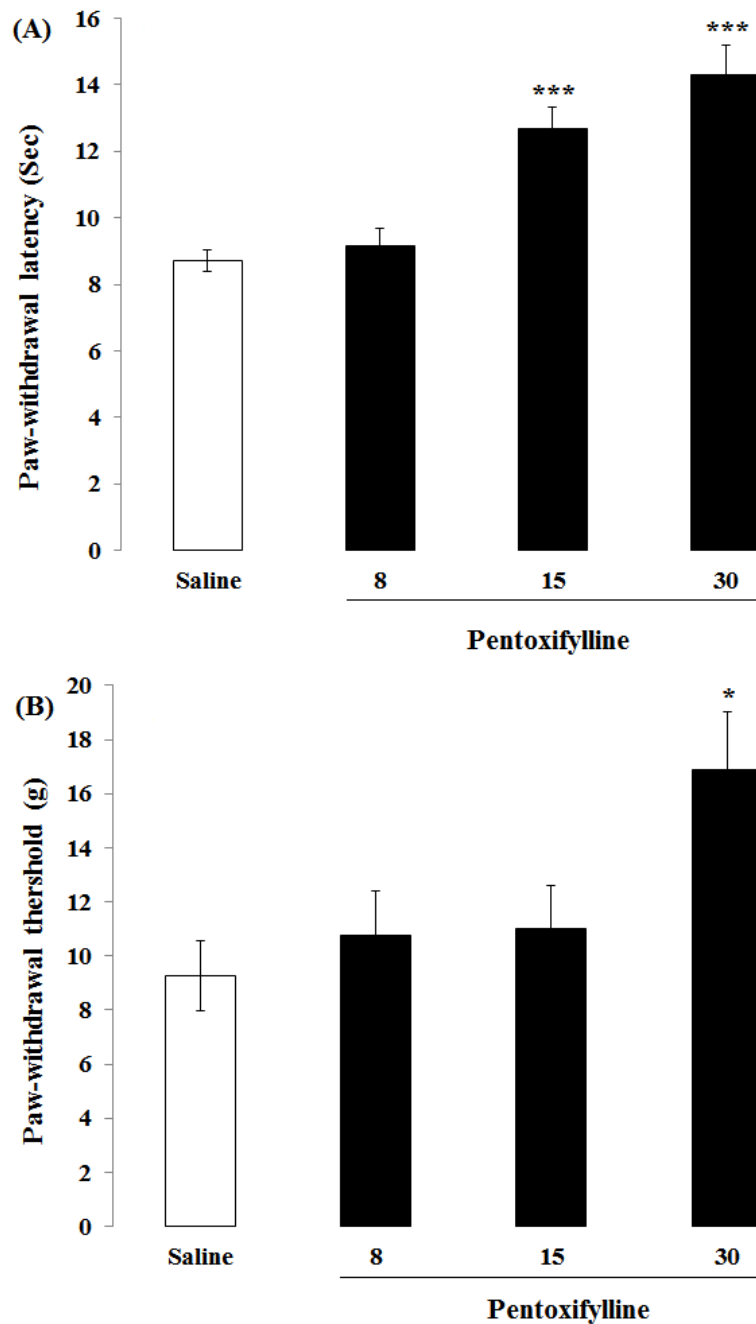
شکل ۳- تغییرات وابسته به زمان اثر ضد دردی دوزهای مختلف مورفین در تست هارگریوز (۲٫۵، ۵، ۷٫۵، ۱۰، ۱۵) mg/kg s.c. * تفاوت معنی‌دار نسبت به قبل از CCI . M: Morphine, MPE: Maximum possible effect * $P < 0.01$ ** $P < 0.001$ *** $(n=8)$



شکل ۴- تغییرات وابسته به زمان اثر ضد دردی دوزهای مختلف مورفین در تست فونفری (۲٫۵، ۵، ۷٫۵، ۱۰، ۱۵) mg/kg s.c. * تفاوت معنی‌دار نسبت به قبل از CCI . M: Morphine, MPE: Maximum possible effect $P < 0.05$ * $(n=8)$

نتایج نشان داده نشده است). به منظور بررسی اثر مهار فعالیت سلول‌های گلیا بر آلودینیای ایجاد شده، از روز ۶ بعد از عمل تا روز ۱۳ به مدت ۸ روز پنتوکسی‌فیلین (۸ mg/kg، ۱۵، ۳۰) به روش داخل صفاقی تزریق شد. آنالیز نتایج با استفاده از تست

مقایسه با گروه سالین ($8/7 \pm 0/31$) داشته است، پاسخ گروه پنتوکسی‌فیلین ۸ میلی گرم در مقایسه با گروه سالین معنی دار نبود، شکل ۵A. در روز ۶ بعد از جراحی و قبل از شروع تزریق پنتوکسی‌فیلین، میزان هاپیرآلژیا در همه گروه‌ها یکسان بود

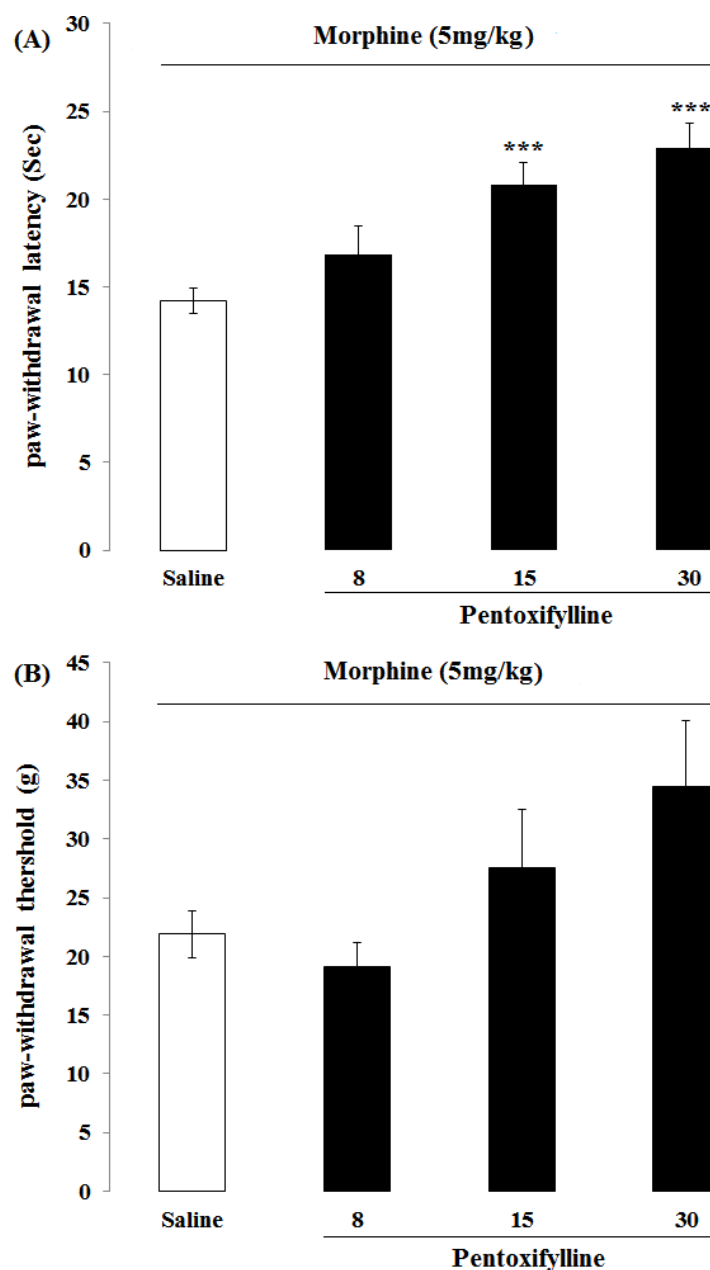


شکل ۵- مقایسه اثر تزریق پنتوکسی‌فیلین (۸، ۱۵، ۳۰ mg/kg i.p.) به مدت ۸ روز از روز ۶ تا ۱۳، روی پاسخ‌های رفتاری در تست هیپروآلژزیای حرارتی (A) و تست آلودینیای مکانیکی (B) ۳۰ دقیقه پس از تزریق آخرین دوز پنتوکسی‌فیلین در روز ۱۳ بعد از CCI (n=8). *** $P<0.001$ * $P<0.05$.

پنتوکسی‌فیلین میزان آلودینیا در همه گروه‌ها یکسان بود (نتایج نشان داده نشده است).

به منظور بررسی اثر پنتوکسی‌فیلین بر بهبود اثر بخشی مورفین در نوروپاتی پس از تزریق آخرین دوز پنتوکسی‌فیلین یک تک دوز مورفین (۵mg/kg s.c.) تزریق شد. با توجه به این که در گروه‌های آزمایشی که دوزهای مختلف مورفین دریافت کرده بودند دوز ۵ میلی گرم مورفین در روز ۶ بعد از

کروس کالوالیس تفاوت معنی‌داری را بین گروه‌ها نشان داد ($p<0.05$). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که مدت زمان عقب کشیدن پای حیوان از محرک مکانیکی در گروه پنتوکسی‌فیلین ۳۰ میلی گرم ($16/88 \pm 2/16$ $p<0/05$) افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه سالین ($9/25 \pm 1/29$) داشته است، پاسخ گروه پنتوکسی‌فیلین ۸ و ۱۵ میلی گرم در مقایسه با گروه سالین معنی دار نبود، شکل ۵B. در روز ۶ قبل از شروع تزریق



شکل ۶- مقایسه اثر تزریق پنتوکسی‌فیلین (۸، ۱۵، ۳۰ mg/kg i.p.) به مدت ۸ روز از روز ۶ تا ۱۳ روی اثر ضد درد مورفین (۵ mg/kg s.c.) در تست‌های رفتاری هیپرالژزیای حرارتی (A) و تست آلودینیایی مکانیکی (B) یک روز پس از تزریق آخرین دوز پنتوکسی‌فیلین، روز ۱۴ بعد از CCI (n=8). ***P<0.001، *P<0.05.

جراحی کاهش معنی داری نسبت به روز قبل از جراحی پیدا کرده بود و در روز ۱۴ نیز این کاهش ادامه داشت، در این بخش از این دوز مورفین استفاده شد تا اثر مهار سلول‌های گلیا را بر کارایی مورفین مورد بررسی قرار دهیم.

آنالیز واریانس یکطرفه نتایج در گروه‌هایی که دوزهای مختلف پنتوکسی‌فیلین دریافت کرده بودند در مقایسه با گروهی که سالین دریافت کرده بود، تفاوت معنی داری را در اثر ضد دردی دوز ۵ میلی گرم مورفین در تست هارگریوز نشان داد

داده که اثر ضد هیپرالژزیایی مورفین در گروه پنتوکسی‌فیلین ۳۰ میلی گرم (p=۰/۰۰۱) و ۱۵ میلی گرم (p=۰/۰۰۱) داشته است (۲۰/۸۵±۱/۲۵) افزایش معنی داری در مقایسه با گروه سالین داشته است (۱۴/۱۹±۲/۰۶).

تفاوت پاسخ در گروه پنتوکسی‌فیلین ۸ میلی گرم در مقایسه با گروه سالین معنی دار نبود، شکل A ۶. در تست فون‌فری، تفاوت معنی داری در اثر ضد آلودینیایی مورفین ۵ میلی گرم در

گروه های دارویی نسبت به گروه سالین دیده نشد، شکل ۶B.

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که بدنبال بستن عصب سیاتیک، هایپرآلژزیای حرارتی و آلودینیای مکانیکی که از مشخصه های مهم دردهای نوروپاتی می باشد، در پای آسیب دیده بوجود می آید که با دردهای نوروپاتی در انسان قابل مقایسه می باشد [۲]. از روز دوم بعد از CCI آلودینیای مکانیکی و در روز ۵ هایپرآلژزی حرارتی ایجاد می شود و در روز ۱۴ به حداکثر خود می رسد [۱۵، ۳۰]. در هفته دوم و سوم بعد از بستن عصب سیاتیک فیبرهای میلین داری که قطر آنها کمتر از ۵ میکرومتر است (فیبرهای Aδ) به میزان زیادی از بین رفته و یا دچار تغییر شده که می تواند در بروز رفتارهای مرتبط با درد نوروپاتیک دخالت داشته باشند [۱۰]. در مدل نوروپاتی CCI بستن عصب سیاتیک باعث ایجاد التهاب و فشار در ناحیه بسته شده عصب می شود، که در اثر این فشار فیبرهای میلین دار بیشتری دچار آسیب می شوند در حالی که فیبرهای بدون میلین C که به فشار حساسیت کمتری دارند کمتر آسیب می بینند [۲۶]. بررسی های میکروسکوپ الکترونی در مدل نوروپاتی CCI نشان داد که در هفته اول بعد از بستن عصب سیاتیک فیبرهای عصبی میلین دار از بین رفته و دو هفته بعد از آن فیبرهای بدون میلین نیز از بین می روند و یا دچار تغییر شکل و فعالیت می شوند. این شواهد نشان می دهند هایپرآلژزی و آلودینیایی که در این مدل ایجاد می شود به علت از بین رفتن اثر مهارتی نورون های میلین دار بر ورودی های آوران های مسیر درد در نخاع و تغییر در ویژگی های فیبرهای بدون C می باشد [۱]. دردهای نوروپاتی به درمان با داروهای متداول درد پاسخ نمی دهند، اپیوئیدها که از دیر باز برای درمان دردهای حاد به کار می روند، کارایی خود را در شرایط نوروپاتی از دست می دهند [۳۸]. مقاومت به مورفین یکی دیگر از ویژگی های دردهای نوروپاتی است [۱۷، ۲۰]. مکانیسم کاهش اثر مورفین در نوروپاتی هنوز به خوبی شناخته نشده است. برخی محققان پیشنهاد می کنند که کاهش رسپتورهای اپیوئیدی بدنبال آسیب نورون های آوران حسی به نخاع می تواند موجب کاهش کارایی مورفین شود [۲۰]. در این مطالعه نتایج بدست آمده از تزریق

دوزهای ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۵ میلی گرم مورفین در روزهای قبل از CCI و روزهای ۶ و ۱۴ بعد از CCI نشان داد اثر ضد دردی مورفین در شرایط نوروپاتی به صورت وابسته به زمان و وابسته به دوز تغییر کرده، که تایید می کند در نوروپاتی با پیشرفت درد باید از دوزهای بالاتر مورفین استفاده نمود. نتایج نشان داد که اثر بی دردی دوز ۵ میلی گرم مورفین در روز ۶ و ۱۴ بعد از نوروپاتی نسبت به روز قبل از جراحی کاهش معنی دار داشته است. پاسخ دوز ۷/۵ میلی گرم مورفین در روز ۶ بعد از نوروپاتی نسبت به روز قبل از عمل کاهش معنی داری نشان نداده ولی در روز ۱۴ اثر آن به طور معنی داری نسبت به روز ۶ و روز قبل از عمل کاهش پیدا کرده است. پاسخ دوزهای ۲/۵ و ۱۰، ۱۵ میلی گرم مورفین در روز ۱۴ نسبت به روز قبل از عمل تفاوت معنی دار نشان نداد. از طرفی در همه دوزها اثر ضد هایپرآلژزیایی مورفین بیشتر از اثر ضد آلودینیایی آن دچار کاهش شده است. مطالعات نشان داده اند بدنبال آکسوتومی محیطی تعداد و تراکم نورون های دارای گیرنده μ در گانگلیون پشتی و شاخ خلفی نخاع در موش و میمون کاهش می یابد، که می تواند یکی از دلایل کاهش کارایی مورفین در نوروپاتی باشد [۳۹]. علاوه بر این بدنبال بستن عصب سیاتیک فیبرهای حسی میلین دار که قطر کمتری دارند آسیب بیشتری می بینند و به موازات آن تراکم رسپتورهای اپیوئیدی μ در همان سمت نخاع در مقایسه با سمت مقابل کاهش می یابد، این کاهش مربوط به از بین رفتن فیبرهای عصبی در سمت آسیب دیده می باشد [۳]. با توجه به این شواهد که بدنبال بستن عصب سیاتیک فیبرهای میلین دار Aδ بیشتر از فیبرهای بدون میلین C آسیب می بینند از بین رفتن اثر مهارتی فیبرهای میلین دار بر ورودی فیبرهای C در نخاع و تغییر فعالیت فیبرهای C همراه با کاهش رسپتورهای اپیوئیدی می تواند در تسهیل انتقال درد و ایجاد هایپرآلژزی و آلودینیا و بروز پدیده تحمل به مورفین نقش داشته باشد.

در قسمت دیگر این مطالعه، از پنتوکسی فیلین به عنوان مهار کننده غیر اختصاصی سلول های گلیا استفاده شد تا اثر مهار سلول های گلیا بر وضعیت درد نوروپاتی و همچنین بهبود اثر ضد دردی مورفین مورد بررسی قرار گیرد، برخی مطالعات نشان داده است که پنتوکسی فیلین بروز درد نوروپاتی را در حیوانات آزمایشگاهی تحت تاثیر قرار می دهد [۱۵، ۱۹] و

روزهای بعد از آن به تدریج اثر آن کم می‌شود [۱۸]. نقش سلول‌های گلیا و سیتوکین‌های آزاد شده از آنها در طی فرایند ایجاد دردهای نوروپاتی را نباید در ایجاد کاهش کارایی مورفین نادیده گرفت [۹، ۱۴، ۳۷]. فعال شدن سلول‌های گلیا و افزایش بیان سیتوکین‌های پیش‌التهابی در نخاع می‌تواند در ایجاد تحمل به مورفین نقش داشته باشد [۲۱، ۲۳، ۲۴]. علاوه بر این اخیراً گزارش شده که میکروگلیاها در پاسخ به مورفین نیز می‌توانند فعال شده و سیتوکین‌های پیش‌التهابی مانند IL-1b، IL-6 و TNF- α را آزاد کنند و از این طریق در کاهش اثر ضد دردی مورفین و ایجاد وابستگی و تحمل به مورفین نقش ایفا کنند [۱۲، ۲۱، ۲۳، ۲۴].

به طور خلاصه نتایج این تحقیق نشان داد بدنال ایجاد نوروپاتی ناشی از بستن عصب سیاتیک اثر ضد دردی مورفین کاهش پیدا می‌کند و تزریق داخل صفاقی پنتوکسی‌فیلین پس از ایجاد آسیب عصبی، هیپرالژیا و آلودینیای ناشی از بستن عصب سیاتیک را کاهش داده و اثر ضد هایپرآلژزیای و ضد آلودینیای مورفین را افزایش می‌دهد. به نظر می‌رسد که پنتوکسی‌فیلین اثرات خود را از طریق مهار سلول‌های گلیا در نخاع اعمال می‌کند. علاوه بر این بهبود اثر ضد دردی مورفین بوسیله مهار کردن سلول‌های گلیا پیشنهاد می‌کند که افزایش فعالیت میکروگلیاها و تولید سیتوکین‌های پیش‌التهابی بدنال آسیب‌های عصبی، موجب کاهش اثر بخشی مورفین در این شرایط می‌شود. این نتایج در کنار شواهد فراوانی که اخیراً بدست آمده، تایید می‌کند که مهار سلول‌های گلیا و مکانیسم‌های نوروایمنی سیستم عصبی می‌تواند به عنوان یک هدف درمانی بالقوه برای درمان دردهای نوروپاتی و آسیب‌های عصبی مورد استفاده قرار گیرد و همچنین می‌تواند موجب بهبود اثر ضد دردی مورفین در این شرایط گردد.

سپاسگزاری

از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه شهید بهشتی جهت حمایت مالی این پروژه تشکر بعمل می‌آید.

زمانی که به صورت پیش درمانی مورد استفاده قرار می‌گیرد می‌تواند دردهای پس از عمل جراحی را در بیماران کاهش دهد [۶، ۲۸]. اثر مصرف پنتوکسی‌فیلین پس از بروز دردهای نوروپاتی هنوز به خوبی مورد بررسی قرار نگرفته است. نتایج این تحقیق نشان داد در گروه‌هایی که پس از بستن عصب سیاتیک، پنتوکسی‌فیلین دریافت کرده بودند نسبت به گروهی که سالیین دریافت کرده علائم درد نوروپاتی بهبود پیدا کرده است. همچنین مصرف روزانه پنتوکسی‌فیلین توانسته اثر ضد دردی مورفین ۵ میلی گرم را افزایش دهد. مشابه این اثر را بعد از استفاده از پروپنتوفیلین در مدل نوروپاتی SNL گزارش شده است [۲۳، ۲۴]. همچنین پنتوکسی‌فیلین با مهار فرآیندهای متابولیکی سلول، مهار سیتوکین‌ها و مهار فسفو دی‌استراز، از تولید سیتوکین‌های پیش‌التهابی از قبیل IL-1b، IL-6 و TNF- α جلوگیری می‌کند [۱۵]. اثر ضد دردی پنتوکسی‌فیلین به علت کاهش تولید سیتوکین‌های پیش‌التهابی از قبیل IL-1، IL-6 و TNF- α از طریق مهار NF- κ B و تحریک تولید IL-10 در مغز و نخاع می‌باشد [۱۵، ۳۳]. جلوگیری از فعال شدن سلول‌های گلیا در مدل نوروپاتی SNL بروز و پیشرفت علائم رفتاری درد نوروپاتی را کاهش می‌دهد. ولی اثری بر درمان هایپرآلژزیای و آلودینیای مکانیکی ایجاد شده حاصل از آسیب‌های عصبی ندارد، هرچند که فعالیت میکروگلیاها را به مقدار زیادی کاهش می‌دهد [۲۴]. عواملی که موجب ایجاد هایپرآلژزیای می‌شوند، غالباً سلول‌های ایمنی را در سیستم عصبی مرکزی و محیطی نیز فعال می‌کنند [۳۵]. به نظر می‌رسد که سلول‌های گلیای فعال شده در نخاع سیتوکین‌های پیش‌التهابی و ترکیبات تحریکی دیگری را آزاد می‌کنند و موجب تسهیل انتقال درد می‌شوند [۹، ۳۴، ۳۷]. بنابراین ممکن است که فعال شدن سلول‌های گلیا در ایجاد دردهای نوروپاتی نقش داشته باشد. برخی مطالعات نشان داده است که استفاده از ترکیبات مهار کننده سلول‌های گلیا قبل از فعال شدن آنها اثر درمانی بیشتری را ایجاد می‌کند [۷، ۲۲]. برای مهار گلیاها در شرایط نوروپاتی یک پنجره زمانی خاصی وجود دارد به نحوی که استفاده از ترکیبات مهار کننده فعالیت گلیاها تا روز ۷ بعد از عمل می‌تواند در پیشگیری از ایجاد نوروپاتی موثر باشد و در

References

- [1] Basbaum AI, Gautron M, Jazat F, Mayes M, Guilbaud G, The spectrum of fiber loss in a model of neuropathic pain in the rat: An electron microscopic study. *Pain* 47 (1991) 359-367.
- [2] Bennett GJ, Xie YK, A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33 (1988) 87-107.
- [3] Besse D, Lombard MC, Perrot S, Besson JM, Regulation of opioid binding sites in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord following loose ligation of the sciatic nerve: Comparison with sciatic nerve section and lumbar dorsal rhizotomy. *Neuroscience* 50 (1992) 921-933.
- [4] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL, Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *JNeurosciMethods* 53 (1994) 55-63.
- [5] Cherny NI, Thaler HT, Friedlander-Klar H, Lapin J, Foley KM, Houde R, Portenoy RK, Opioid responsiveness of cancer pain syndromes caused by neuropathic or nociceptive mechanisms: A combined analysis of controlled, single-dose studies. *Neurology* 44 (1994) 857-861.
- [6] Dobrogowski J, Wrzosek A, Wordliczek J, Radiofrequency denervation with or without addition of pentoxifylline or methylprednisolone for chronic lumbar zygapophysial joint pain. *PharmacolRep* 57 (2005) 475-480.
- [7] Dorazil-Dudzic M, Mika J, Schafer MK, Li Y, Obara I, Wordliczek J, Przewlocka B, The effects of local pentoxifylline and propentofylline treatment on formalin-induced pain and tumor necrosis factor-alpha messenger rna levels in the inflamed tissue of the rat paw. *AnesthAnalg* 98 (2004) 1566-1573.
- [8] Dworkin RH, Backonja M, Rowbotham MC, Allen RR, Argoff CR, Bennett GJ, Bushnell MC, Farrar JT, Galer BS, Haythornthwaite JA, Hewitt DJ, Loeser JD, Max MB, Saltarelli M, Schmader KE, Stein C, Thompson D, Turk DC, Wallace MS, Watkins LR, Weinstein SM, Advances in neuropathic pain: Diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. *ArchNeurol* 60 (2003) 1524-1534.
- [9] Eriksson NP, Persson JK, Svensson M, Arvidsson J, Molander C, Aldskogius H, A quantitative analysis of the microglial cell reaction in central primary sensory projection territories following peripheral nerve injury in the adult rat. *Exp Brain Res* 96 (1993) 19-27.
- [10] Gautron M, Jazat F, Ratinahirana H, Hauw JJ, Guilbaud G, Alterations in myelinated fibres in the sciatic nerve of rats after constriction: Possible relationships between the presence of abnormal small myelinated fibres and pain-related behaviour. *NeurosciLett* 111 (1990) 28-33.
- [11] Hains BC, Waxman SG, Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury. *JNeurosci* 26 (2006) 4308-4317.
- [12] Hamidi GA, Manaheji H, Janahmadi M, Salami M, Pre-emptive effects of mk-801 and morphine on behavioural responses in experimental chronic constriction sciatic nerve injury in adult male rats. *Physiol Pharmacol* 10 (2006) 41-47.
- [13] Keil GJ, 2nd, Delander GE, Time-dependent antinociceptive interactions between opioids and nucleoside transport inhibitors. *JPharmacolExpTher* 274 (1995) 1387-1392.
- [14] Ledebor A, Sloane EM, Milligan ED, Frank MG, Mahony JH, Maier SF, Watkins LR, Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. *Pain* 115 (2005) 71-83.
- [15] Kim KJ, Yoon YW, Chung JM, Comparison of three rodent neuropathic pain models. *ExpBrainRes* 113 (1997) 200-206.
- [16] Mayer DJ, Mao J, Holt J, Price DD, Cellular mechanisms of neuropathic pain, morphine tolerance, and their interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (1999) 7731-7736.
- [17] McQuay HJ, Neuropathic pain: Evidence matters. *EurJPain* 6 Suppl A (2002) 11-18.
- [18] Mei XP, Xu H, Xie C, Ren J, Zhou Y, Zhang H, Xu LX, Post-injury administration of minocycline: An effective treatment for nerve-injury induced neuropathic pain. *NeurosciRes* 70 (2011) 305-312.
- [19] Mika J, Osikowicz M, Makuch W, Przewlocka B, Minocycline and pentoxifylline attenuate allodynia and hyperalgesia and potentiate the effects of morphine in rat and mouse models of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 560 (2007) 142-149.
- [20] Porreca F, Tang QB, Bian D, Riedl M, Elde R, Lai J, Spinal opioid mu receptor expression in lumbar spinal

- cord of rats following nerve injury. *BrainRes* 795 (1998) 197-203.
- [21] Raghavendra V, Rutkowski MD, DeLeo JA, The role of spinal neuroimmune activation in morphine tolerance/hyperalgesia in neuropathic and sham-operated rats. *JNeurosci* 22 (2002) 9980-9989.
- [22] Raghavendra V, Tanga F, DeLeo JA, Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *JPharmacolExpTher* 306 (2003) 624-630.
- [23] Raghavendra V, Tanga FY, DeLeo JA, Attenuation of morphine tolerance, withdrawal-induced hyperalgesia, and associated spinal inflammatory immune responses by propentofylline in rats. *Neuropsychopharmacology* 29 (2004) 327-334.
- [24] Raghavendra V, Tanga F, Rutkowski MD, DeLeo JA, Anti-hyperalgesic and morphine-sparing actions of propentofylline following peripheral nerve injury in rats: Mechanistic implications of spinal glia and proinflammatory cytokines. *Pain* 104 (2003) 655-664.
- [25] Raivich G, Like cops on the beat: The active role of resting microglia. *Trends in Neurosciences* 28 (2005) 571-573.
- [26] Seltzer Z, Dubner R, Shir Y, A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43 (1990) 205-218.
- [27] Song P, Zhao ZQ, The involvement of glial cells in the development of morphine tolerance. *NeurosciRes* 39 (2001) 281-286.
- [28] Szczepanik AM, Wordliczek J, Srednicki W, Siedlar M, Czupryna A, Pentoxifylline does not affect nociception if administered postoperatively. *PolJPharmacol* 56 (2004) 611-616.
- [29] Tawfik VL. *The role of glia in neuropathic pain: A journey into the tetrapartite synapse* [dissertation]. Dartmouth College., 2006.
- [30] Tawfik VL, Regan MR, Haenggeli C, LaCroix-Fralish ML, Natile-McMenemy N, Perez N, Rothstein JD, DeLeo JA, Propentofylline-induced astrocyte modulation leads to alterations in glial glutamate promoter activation following spinal nerve transection. *Neuroscience* 152 (2008) 1086-1092.
- [31] Tsuda M, Inoue K, Salter MW, Neuropathic pain and spinal microglia: A big problem from molecules in "Small" Glia. *TrendsNeurosci* 28 (2005) 101-107.
- [32] Tsuda M, Mizokoshi A, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Inoue K, Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal hyperactive microglia contributes to pain hypersensitivity following peripheral nerve injury. *Glia* 45 (2004) 89-95.
- [33] Vale ML, Benevides VM, Sachs D, Brito GA, da Rocha FA, Poole S, Ferreira SH, Cunha FQ, Ribeiro RA, Antihyperalgesic effect of pentoxifylline on experimental inflammatory pain. *BrJPharmacol* 143 (2004) 833-844.
- [34] Wagner R, DeLeo JA, Heckman HM, Myers RR, Peripheral nerve pathology following sciatic cryoneurolysis: Relationship to neuropathic behaviors in the rat. *ExpNeurol* 133 (1995) 256-264.
- [35] Watkins LR, Maier SF, Goehler LE, Immune activation: The role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. *Pain* 63 (1995) 289-302.
- [36] Watkins LR, Milligan ED, Maier SF, Spinal cord glia: New players in pain. *Pain* 93 (2001) 201-205.
- [37] Watkins LR, Milligan ED, Maier SF, Glial activation: A driving force for pathological pain. *TrendsNeurosci* 24 (2001) 450-455.
- [38] Watkins LR, Hutchinson MR, Rice KC, Maier SF, The "Toll" Of opioid-induced glial activation: Improving the clinical efficacy of opioids by targeting glia. *Trends Pharmacol Sci* 30 (2009) 581-591.
- [39] Zhang X, Bao L, Shi TJ, Ju G, Elde R, Down-regulation of mu-opioid receptors in rat and monkey dorsal root ganglion neurons and spinal cord after peripheral axotomy. *Neuroscience* 82 (1997) 223-240.
- [40] Zhuo M, Wu G, Wu L-J, Neuronal and microglial mechanisms of neuropathic pain. *MolecularBrain* 4 Zimmermann M, Pathobiology of neuropathic pain. *EurJ Pharmacol* 429 (2001) 23-37.