

교신신저자: 백윤웅  
주소: 광주광역시 광산구 신창동 683-3  
Tel: 062-958-7641, 011-231-8685  
e-mail: paekyw@www.kjhc.ac.kr

## Carrageenan으로 유도된 염증성 근통증 흰쥐 모델에서 냉치료에 의한 척수의 c-fos의 발현

광주보건대학 물리치료과  
백 윤 웅

### Expression of spinal cord c-fos with cold therapy in rats of carrageenan-induced inflammatory muscle pain

Paek, Yun-Woong, Ph.D.

*Department of Physical Therapy, Kwangju Health College*

#### <Abstract>

Expression of c-fos, an immediate early gene, has accepted to be a marker of functional activity in neurons. This study was aimed to investigate the effects of cold therapy on the expression of spinal cord c-fos in rats of carrageenan-induced muscle pain. Muscle pain was induced in male Sprague-Dawley rats by intra-muscular injection of gastrocnemius with 2% carrageenan. The paw withdrawal latency (PWL) and tail flick test (TFT) responses to heat stimuli were used to detect secondary hyperalgesia produced by the muscle pain and measured to assess the effects of cold. The expression of c-fos was determined in the lumbar regions of the spinal cord by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry assays.

The secondary hyperalgesia to heat stimuli (PWL and TFT) were significantly reduced in cold therapy compared with that in the controls. In RT-PCR assays the expression of c-fos mRNA was down-regulated in the lumbar spinal cord in cold group. In addition, Fos immunoreactivity in the dorsal horn of the lumbar spinal cord was decreased in cold group.

These results suggested that application of cold attributed to increase PWL and TFT responses and to decrease expression of the c-fos produced by muscle pain.

#### I. 서 론

인류가 시작된 이후로 수 많은 사람들이 통증에 시달려 왔고 통증의 완화를 위하여 대부분 약물에 의존하여 왔지만 약물의 부작용 때문에(Kawamori 등, 1998; Peter와 Peter, 1997)

침술, 진동요법(vibration therapy) 및 저출력 레이저 등과 같은 대체치료기법들이 물리치료(physical therapy)의 발전과 더불어 발전해 왔다. 그러나 통증연구에서 통증은 감각이기 때문에 정량화하기가 매우 어려운 점이 있어 진통효과에 대한 객관적인 평가가 이루어지지 않아 논란의 여지가 많은 실정이다(England, 1998; Walker, 1983). 예를 들어 환자에 의한 강도의 등급, 사용된 진통제의 양, 통증에 반응하는 행동반응 측정 등이다. 이러한 측정들은 환자의 주관적인 감정에 호소되어 오차가 많이 나는 부정확한 면이 있다. 물리치료의 효과와 그에 관련된 생리적 기작을 밝히기 위한 연구가 동물모델을 통해서 진행되고 있지만 이 분야가 특히 임상기술에 의존하는 분야라서 그 기작을 밝히는 연구자가 적어 아직도 미흡한 현실에 있다. 그래서 본 연구는 분자생물학적 기법을 사용하여 물리치료 효과를 확인하기 위한 일환으로 연구되어졌다.

c-fos는 다양한 유해한 자극 후에 척수에서 빠르게 발현되는 immediate early gene이다. c-fos 유전자 산물인 Fos 단백질은 다른 핵단백질인 Jun과 heterodimeric complex를 이룬다. Fos-Jun 복합체는 표적유전자의 downstream 발현을 조절하는 DNA의 AP-1에 붙어 많은 생리적 반응들을 조절한다. 말초유해자극 초기에 반응하여 신경계에서 발현되는 c-fos는 통증연구의 신경학적 표지자(marker)로 사용되어지고 있다(Harris, 1998; Yamagata 등, 1993; Adams 등, 1996). Hunt 등(1987)에 보고된 이래로 열, 기계적, 화학적 자극을 포함한 다양한 유형의 유해자극은 뇌와 척수에서 c-fos의 발현을 유도한다는 연구결과를 보여 주었다(Bullitt 등, 1992).

그리고 통증을 경감시키기 위한 치료법으로 냉치료, 전기치료, 열치료, 도수치료 등이 있는데(Wright와 Sluka, 2001) 그 중에서 냉의 적용은 통증과 종창을 감소시키고(Webb 등, 1998) 염증성 침출물질의 분비를 억제시키며, 이차적인 조직 손상을 예방하는데 효과적이다(Olson, 1972; Merrick 등, 1999; Kenjo 등, 2002).

그래서 본 연구에서는 2% carrageenan을 흰쥐의 비복근(gastrocnemius muscle)에 근육주사하여 근통증 모델을 확립한 후에 냉을 적용하였다. 이차성 열 통각과민을 알아보기 위하여 꼬리치기와 열판 검사와 같은 행동반응(behavioral assessment)을 측정하였고, 척수에서 신경세포의 활성을 알아보기 위하여 c-fos의 발현 수준을 RT-PCR과 면역조직화학염색법으로 분석하여 냉의 적용 전과 후를 비교하였다.

## II. 연구 방법

### 1. 근통증의 유발

230~250g의 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley)의 왼쪽 후하퇴 비복근에 멸균된 PBS에 용해된 2% carrageenan, 0.1ml를 근육 주사하였다.

### 2. 냉적용

냉치료는 근통증을 유발시킨 후, 4시간 후에 적용하였으며 냉치료를 적용하기 전에 2% halothane으로 마취를 시켰다. 마취된 쥐의 근통증 부위를 4°C의 물이 20분간 순환되도록 장치하였다.

### 3. 행동반응 측정

근통증에 대한 행동반응을 측정하기 위해 발 움추림 잠복기(paw withdrawal latency, PWL)와 꼬리치기 검사(tail flick test, TFT)를 실시하였다. PWL은 체중을 지지하고 있는 쥐의 족저면에 열을 적용한 순간부터 발을 들어올리는데까지의 시간으로 결정하였다. 먼저 쥐를 30℃를 유지하고 있는 열판 위에 올려놓고 적응을 위해 15분간을 두었다가 적응 시간이 끝나면 열을 53±0.01℃로 상승시켜 PWL의 시간을 측정하였다.

TFT를 측정하기 위해 쥐의 체형에 맞게 제작된 원통형으로 생긴 작은 실험관에 넣고 꼬리만 밖으로 나오게 하였다. 적응을 위해 5분의 시간을 주고 적응 시간이 끝나면 53℃로 가열된 증류수가 채워진 비이커 안에 쥐의 꼬리 끝을 넣어 꼬리치기가 일어나기까지의 시간을 측정하였다.

PWL과 TFT를 측정시 열에 대한 쥐의 손상을 피하기 위하여 제한시간은 20초로 하였고 5분 간격으로 3번 측정하여 평균 시간을 계산하였다.

### 4. 요수부위의 RNA 추출과 RT-PCR를 이용한 c-fos mRNA의 expression 비교

Ultraspec<sup>TM</sup> RNA 분리제 (Biotech Laboratories, Inc., Houston, Tx, USA)를 이용하여 Chomczynski와 Sacchi(1987)의 방법으로 척수로부터 total RNA를 분리해냈다. 즉 0.1g의 얼린 척수조직을 1 ml의 Ultraspec<sup>TM</sup> RNA 용액에서 Polytron homogenizer (KINEMATIKA)로 균질화한 후 4℃에 5분간 incubation하였다. 다음에 Ultraspec<sup>TM</sup> RNA 용액 1 ml당 0.2 ml의 chloroform을 첨가하고 15초 동안 samples을 격렬하게 섞고 4℃에 5분간 incubation하였다. 균질액을 12,000 g, 4℃에서 15분동안 원심분리한 후 상층액을 새로운 eppendorf tube에 옮겼다. 동량의 isopropanol을 첨가하여 시료를 4℃에서 10분간 incubation한 후 12,000 g, 4℃에서 15분 동안 원심분리하여 RNA를 침전시켰다. 상층액을 제거하고 RNA pellet을 75% ethanol 1ml로 세번 세척하였다. RNA pellet을 공기 중에서 말린 후 DEPC를 처리한 물에 용해시켜 260 nm에서 흡광도를 측정하여 RNA를 정량하였다. 역전사(reverse transcription)를 위하여 total RNA 1 µg을 200 U reverse transcriptase (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 10 U RNasin, dNTP mix (0.5 mmol/L), DTT (10 mmol/L), MgCl<sub>2</sub> (2.5 mmol/L), oligo (dT) (0.5 µg), reaction buffer [200 mmol/L Tris-HCl (pH 8.4), 500 mmol/L KCl]에 첨가하여 최종 volume이 20 µL가 되게 하여 Gibco사의 절차에 따랐다. c-fos의 PCR 조건은 94℃에서 1분간 denaturation, 60℃에서 1분간 annealing, 72℃에서 1분간 extension step을 밟았다. β-actin은 94℃에서 45초간 denaturation시킨 후, 56℃에서 45초간 annealing, 72℃에서 1분 30초간 extension 시켰다. c-fos 그리고 β-actin (Abssi 등, 1998)의 oligonucleotide 서열은 다음과 같다. c-fos primers (sense primer, 5'-TCCCAGAGGAGATGTCTGTG-3', antisense primer 5'-GGCTCCAGCTCTGTGACCAT-3')을 이용하며, 최종산물은 409 bp fragment이다. β-actin primers는 (sense primer: 5'-GACTACCTCATGAAGATCCTGACC-3': antisense primer: 5'-TGATCTTCATGGTGCTAGGAGCC-3')을 이용하며, 최종산물은 423bp fragments이다. PCR을 위하여 c-fos와 β-actin 각 primer 20 pmole, dNTP mix (250 µmol/L), MgCl<sub>2</sub> (1.5 mmol/L), 1U Taq polymerase를 혼합하여 최종 volume 20 µL

를 만들어 사용하였다. PCR로 증폭된 반응 산물은 ethidium bromide가 함유된 agarose gel에 전기영동하여 UV transilluminator로 비추어 사진을 찍은 후 c-fos mRNA의 발현정도를 IMAGER™ & 1D MAIN (Bioneer, Korea)을 이용하여 정량하였다.

## 5. 요수 조직에서의 Fos의 면역조직화학염색(Immunohistochemistry)

본 실험에 사용된 흰쥐는 carrageenan 투여 24시간 후에 희생시켰다. 실험 동물을 halothane으로 마취한 후에 해부대 위에 고정하고 흉부를 절개하여 심장을 노출시켰다. pH 7.4의 phosphate buffered saline(PBS) 용액으로 심장 관류하여 혈액을 제거하며, 다시 4% paraformaldehyde로 재관류하여 조직을 고정하였다. 이후 실험동물의 등을 절개하여 노출된 척추를 조심스럽게 제거한 후 척수 중 요수팽대부를 적출하여 4% paraformaldehyde에서 3시간 동안 실온에서 고정한 후, 30% sucrose 용액속에서 4℃의 온도로 overnight 시켰다. 조직을 optimal cutting temperature compound(O.C.T., American Optical)로 포매하고, Cryocut II(Lecica CM 3000, -25℃)를 사용하여 15 $\mu$ m 두께의 종단면 연속절편을 얻었다. 각 절편은 1% gelatin으로 코팅된 슬라이드 위에 thaw mount 한 후 슬라이드 상자에 넣어 면역조직화학염색법을 시행하기 전까지 -80℃에서 보관하였다. 냉동 보관된 실험동물의 척수 조직들은 실온에서 면역조직화학염색법을 시행하였다. 준비된 조직들은 동시에 염색하여 염색 처리에서 발생 할 수 있는 개체간 차이를 최소화하였다. 각 조직에서 Fos의 면역조직화학적 염색은 기본적으로 Avidin Biotin Complex(ABC) horseradish peroxidase 기술을 사용하여 시행하였다. 먼저 조직 절편을 0.02M PBS로 10분씩 3회 세척하였다. 비특이 면역 반응을 최소화하기 위해 normal goat serum(0.1%)을 30분 동안 처리하였다. 그 후 polyclonal rabbit anti-c-fos (Sigma)를 PBS에 각각 1:1000 비율로 희석하여 인접 조직위에 처리하고 4℃의 습윤 상자에서 12시간 동안 반응시켰다. 항원-항체 복합체를 avidin biotin peroxidase 방법으로 발색시켜, 조직을 PBSDH 3회 10분간씩 세척한 후, endogenous peroxidase 활성을 억제하기 위하여 0.5% periodic acid를 5분간 처리하였다. Biotin이 부착된 2차 항체 (biotinylated goat anti mouse antisera와 biotinylated goat anti rabbit antisera, 1:200, 1:500 in PBS)를 실온에서 50분 동안 처리한 후 다시 PBS로 3회 10분간씩 세척하였다. ABC complex(ABC kit, Vectastain)로 1시간 동안 반응시킨 후 조직을 PBS로 2번 세척하고 0.02M PBS 완충액으로 다시 세척한 다음 정색 반응을 시행하였다. 조직을 0.05% diaminobenzidine(Sigma), 0.04% NiCl, 0.003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 첨가된 PBS 완충액에 5-10분간 반응시켜 각 항체들에 대한 면역반응을 발색시켰다. 탈수, 투명화를 거친 후 universal mount로 mount하고 Nilmarskii interference microscope(Olympus)로 사진 작업을 수행하였다.

## 6. 자료처리

PWL과 TFT에서의 변화는 ANOVA를 이용하여 비교하였고, 사후검정은 Tukey 검정법을 이용하였다. RT-PCR에서 얻은 결과는 student t-test를 이용하였다. 통계학적 유의수준은 .05로 하였고, SPSS 10.0 for Window를 사용하여 통계 처리하였다.

## III. 결 과

## 1. 냉을 적용한 후 경과시간대별 실험군간 PWL, TFT의 변화

Carrageenan을 투여하기 전과 투여한 후 4시간에서 대조군과 실험군간에 PWL과 TFT 변화는 없었다(Table. 1, 2). 그러나 약물 투여 후 10시간과 24시간에서는 carrageenan군과 냉을 적용된 실험군간의 PWL과 TFT 변화는 유의한 차이를 보였다(Table. 1, 2). PWL과 TFT의 차이는 이차성 열 통각과민이 유발된 후에 냉이 적용된 실험군의 PWL과 TFT은 냉을 적용하지 않은 carrageenan군에 비해 상승되었다. 이는 이차성 열 통각과민이 유발되어 감소된 PWL과 TFT가 냉적용에 의해 다시 상승하게 되며, 냉적용은 이차성 열 통각과민을 감소시키는데 효과가 있음을 보여준다.

**Table. 1. PWL difference between groups in each time (unit: sec)**

Time	carrageenan	carrageenan + cold	F	p
Baseline	12.00±0.76	11.50±1.20	.674	.520
Hour 4	6.13±1.46	5.38±0.92	2.038	.155
Hour10	5.75±1.04	8.88±0.64	52.929	.000*
Hour 24	6.00±1.07	10.88±0.84	88.440	.000*

mean±SD

\* p<.05

**Table. 2. TFT difference between groups in each time (unit : sec)**

Time	carrageenan	carrageenan + cold	F	p
Baseline	11.38±0.52	11.63±0.52	.339	.717
Hour 4	5.38±0.52	5.25±0.46	0.179	.848
Hour10	6.00±0.76	9.00±0.53	31.764	.000*
Hour 24	5.40±0.53	11.00±0.76	273.000	.000*

mean±SD

\* p<.05

## 2. 비복근에서의 c-fos mRNA의 변화

Carrageenan을 투여한 실험군과 carrageenan을 투여하고 냉을 적용한 실험군에서 c-fos mRNA의 발현 정도를 RT-PCR 분석을 통해 비교한 결과 carrageenan을 투여한 후, 24시간

이 지난 carrageenan 실험군에서 c-fos mRNA가 대조군에 비해서 현저히 증가하였으며, carrageenan을 투여하고 4시간 후 냉을 적용한 실험군에서는 carrageenan으로 증가된 c-fos mRNA가 대조군 수준으로 유의성 있게 감소하였다(Fig. 1).

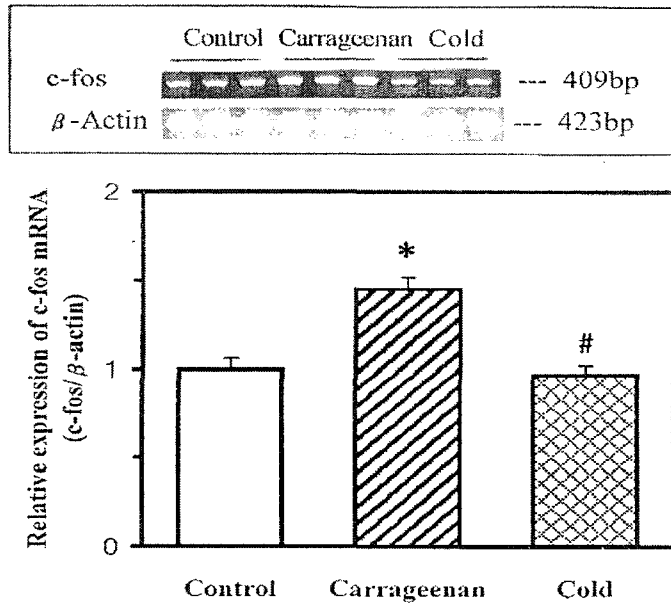


Fig. 1. Expression of c-fos mRNA in the lumbar spinal cord. Levels of c-fos mRNA expression were determined using RT-PCR technique. Each column are presented the densitometric analysis. \* means  $p < .05$  vs. control. # means  $p < .05$  vs. carrageena.

### 3. 요수 조직에서의 Fos의 면역조직화학염색(Immunohistochemistry)

각 그룹들의 요수 조직들에 대해 Fos 면역조직화학염색 반응을 검사하였는데 흑갈색으로 발색되어 나타났다. Carrageenan을 투여하지 않은 그룹에 비해 투여한 군에서 높은 Fos 면역반응을 볼 수 있었다(Table. 3). Carrageenan을 투여한 군과 냉을 적용한 실험군의 면역반응은 냉을 적용한 군에서 훨씬 낮은 면역 반응을 볼 수 있었다. Carrageenan을 투여하여 발생한 근육통에 있어, 중추 감각에 영향을 미치는 Fos는 냉의 적용에 의해 그 발현이 감소되었고 중추 감각에 의해 일어나는 이차성 통각과민의 감소에도 영향을 미칠 수 있다는 것을 알 수 있었다.

Table. 3. Fos immunoreactivity of in the lumbar spinal cord

	non-Carrageenan	Carrageenan	Carrageenan + cold
Immunoreactivity	--	+++	+

The relative number of immunoreactive cells for Fos was subjectively rated as follows(--, rare; +, a few; +++, abundant)

#### IV. 고 찰

통증을 감소시키기 위한 냉 적용은 오래 전부터 사용되어 왔으나 그 효과에 대한 근거는 불분명한 상태이다. 냉의 국소 적용은 피부, 근육, 관절내, 즉 통증부위의 온도를 저하시켜 (Oosterveld 등, 1992; Merrick 등, 1993), 감각신경 종말의 자극 역치를 상승시킨다 (Lehmann과 Lateur, 1982). 그리고 신경섬유와 감각수용체의 활성화를 억제시켜 말초의 구심성 신경섬유의 통증 전달을 지연 또는 차단하는 역할을 한다(Halar 등, 1980). 또한 피부의 반대자극제로 작용하여 통증을 완화시키며, 반사성 근육이완으로 근긴장을 완화시켜 근방추의 흥분도를 감소시킨다. 본 연구의 결과에서 이차성 열 통각과민에 대한 냉의 적용으로 발 움추림 잠복기와 꼬리치기 검사의 증가를 보여 이차성 열 통각과민이 감소되었는데 이러한 결과는 슬관절의 동물모델에서 냉 적용이 이차성 열 통각과민을 감소시킨 Sluka 등 (1999)의 연구 결과와 유사하였다. 냉 적용 후의 이차성 열 통각과민의 감소 결과로부터 냉 적용이 척수 신경원의 활동을 감소시키고 확장된 수용야를 감소시켰다고 생각된다. 그러나 Williams 등(1986)은 냉 적용의 효과는 통증성 냉 자극에 의한 상행성 통증경로의 교란과 하행성 통증 조절경로의 활성으로 나타나는 반자극 효과라 하였다.

척수후각 신경원의 감각 과정에 통증전달에 관여하는 일차구심성 섬유의 활성화와 이때 유리되는 신경전달물질인 흥분성 아미노산 및 신경펩타이드가 중요한 역할을 할 것이라 생각되고 있으며, 신경의 흥분성이 증가되면 신경 세포체에 Fos 단백질이 발현된다. 중추신경계에 있어서 c-fos는 유해수용성 처리과정에 관여하고 있으며 c-fos가 최근에까지 유해수용성 연구에 많이 이용되었고 유해수용성과 신경학적 연구에서 유해자극에 대한 반응에 있어서 척수신경세포의 활성을 확인하는 기능적 표지자 또는 도구로써 사용되고 있다(Harris, 1998). 이러한 이유로 현재 유해성 자극에 의한 신경 활동성의 지표로 c-fos가 이용되고 있으며 중추신경계에서 신호 전달 경로를 추적하는데 중요한 방법으로 사용되고 있다(Bullitt 등, 1992). 그리고 유해수용성(nociception) 연구에 c-fos가 이용되는 논문의 수는 날로 증가 추세에 있으며(Harris, 1998) 통증연구에서도 c-fos의 발현수준을 분석한다면 물리치료의 효과를 평가하는데 보다 좋은 객관적인 자료가 되리라 생각된다.

그래서 본 연구에서도 신경계의 기능적 활성의 표지자인 c-fos의 mRNA와 단백질을 요수 팽대부에서 조사하였다. Carrageenan을 투여한 군과 carrageenan을 투여하고 냉을 적용한 실험군에서 c-fos mRNA의 발현 정도를 RT-PCR 분석을 통해 비교한 결과 carrageenan을 투여한 후, 24시간이 지난 carrageenan 실험군에서 c-fos mRNA가 대조군에 비해서 현저히 증가하였으며, carrageenan을 투여하고 4시간 후 냉을 적용한 실험군에서는 carrageenan으로 증가된 c-fos mRNA가 대조군 수준으로 유의성 있게 감소하였다. 또한 요수 팽대부에서의 면역조직화학염색법으로 Fos 단백질의 발현을 조사한 결과 일차 유해수용

성 구심섬유의 끝부분에 해당하는 후각에 Fos가 발현되었다. 이러한 결과는 흰쥐의 뒷 발바닥에 formalin을 주사하여 요수 L3-L5의 후각에 Fos가 다량 발현되었다가 냉의 적용에 의하여 감소되고 대조군에 비하여 부종(swelling)의 크기도 상대적으로 줄어든 결과와 일치하였다(Kenjo 등, 2002). 따라서 일차 구심성 신경 섬유를 통한 외측척수시상로에의 통증의 전도는 냉의 적용에 의해 척수 후각 신경원의 신경활동을 감소시킴을 보여주었다.

## V. 결 론

흰쥐의 비복근에 carrageenan을 근육주사하여 근통증 모델을 확립한 후, 냉을 적용하였다. 행동반응을 측정한 결과 PWL과 TFT 모두에서 약물 투여 후 10시간과 24시간에서 carrageenan군과 냉을 적용한 실험군 사이에서 유의한 차이를 보였다. 이는 냉 적용이 중추 감각에 의해 나타나는 이차성 열 통각과민을 감소시킴을 보여준다. 중추 감각에 의해 발생한 통각과민에 중요하게 기여하는 신경물질인 c-fos의 발현을 RT-PCR 분석과 면역조직화학염색법을 통해 분석한 결과, 요수 팽대부의 c-fos mRNA와 Fos 단백질의 발현이 carrageenan에 의해 증가되었다가 냉의 적용에 의해 대조군 수준으로 감소됨을 알 수 있었다. 이러한 냉 적용 그룹에서의 이차성 열 통각과민의 감소와 요수에서의 c-fos 발현의 감소는 근 통증에 대한 냉치료가 효과적임을 보여준다.

## 감사의 글

본 연구는 2002년도 광주보건대학 교내연구비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## < 참 고 문 헌 >

- Abassi Z, Gurbanov K, Rubinstein I et al : Regulation of intrarenal blood flow in experimental heart failure: role of endothelin and nitric oxide, *Am J Physiol*, 274(4 Pt 2), F766-74, 1998.
- Adams J, Collaco-Moraes Y, de Belleruche J : Cyclooxygenase-2 induction in cerebral cortex: an intracellular response to synaptic excitation, *J Neurochem*, 66, 6-13, 1996.
- Bullitt D, Lee CL, Light AR et al : The effect of stimulus duration on noxious-stimulus induced c-Fos expression in the rodent spinal cord, *Brain Res*, 580, 172-179, 1992.
- Chomczynski P, Sacchi N : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal Biochem*, 162, 156-159, 1987.
- England S : Introduction to mild laser therapy, *Physiotherapy*, 74(3), 100-102, 1998.
- Halar EM, DeLisa JA, Brozovich FV : Nerve conduction velocity : Relationship of skin, subcutaneous and intramuscular temperatures, *Arch Phys Med Rehabil*, 61, 199-203, 1980.



- Harris JA : Using *c-fos* as a neural marker of pain, *Brain Research Bulletin*, 45(1), 1-8, 1998.
- Hunt SP, Pini A, Evan G : Introduction of *c-fos*-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation, *Nature*, 328, 632-634, 1987.
- Kawamori T, Rao CV, Seibert K et al : Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis, *Cancer Research*, 58, 409-412, 1998.
- Kenjo T, Kikuchi S, Konno S : Cooling decreases *fos*-immunoreactivity in the rat after formalin injection, *Clinical Orthopedics and Related Research*, 394, 271-277, 2002.
- Lehmann JF, De Lateur BJ : Cryotherapy, In Lehmann JF (ed), *Therapeutic Heat and Cold*, Ed 3, Baltimore, Williams & Wilkins, 563-602, 1982.
- Merrick MA, Knight KL, Ingersoll CD et al : The effects of ice and compression wraps on intramuscular temperatures at various depths, *J Athl Train*, 28, 236-245, 1993.
- Merrick MA, Rankin JM, Andres FA et al : A preliminary examination of cryotherapy and secondary injury in skeletal muscle, *Med Sci Sports Exerc*, 31(11), 1516-1521, 1999.
- Olson JE : A review of cryotherapy, *Physiotherapy*, 52, 840-853, 1972.
- Oosterveld FGJ, Rasker JJ, Jacobs JWG et al : The effect of local heat and cold therapy on the intraarticular and skin surface temperature of the knee, *Arthritis Rheum*, 35, 146-151, 1992.
- Peter EL, Peter CI : Outcome of specific COX-2 inhibition in rheumatoid arthritis, *J Rheumatol*, 24, 9-14, 1997.
- Sluka KA, Christy MR, Peterson WL et al : Reduction of pain-related behaviors with either cold or heat treatment in an animal model of acute arthritis, *Arch Phys Med Rehabil*, 80, 313-317, 1999.
- Walker J : Relief from chronic pain by lower power laser irradiation, *Neurosci Lett*, 42, 339-344, 1983.
- Webb JM, Williams D, Ivory JP et al : The use of cold compression dressings after total knee replacement : a randomized controlled trial, *Orthopedics*, 21(1), 59-61, 1998.
- Williams J, Harvey J, Tannenbaum H : Use of superficial heat versus ice for the rheumatoid arthritic shoulder; a pilot study, *Physiotherapy*, 38, 8-13, 1986.
- Wright A, Sluka KA : Nonpharmacological treatments for musculoskeletal pain, *Clin J Pain*, 17(1), 33-46, 2001.
- Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE et al : Expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids, *Neuron*, 11, 371-386, 1993.