

اثر عصاره آبی گیاه شبم خورشید (*DROSERA SPATULATA*) بر سرعت شلیک نوروں های هسته ی پاراژینگانتوسولولاریسی پس از القای درد توسط فرمالین در موش سفید بزرگ

سحر گلابی^۱، مجید حسن پور عزتی^{۲*}، کامبیز رهام پور^۳
 ۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس
 ۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران
 ۳. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

پذیرش: ۱۳ تیر ۸۹

دریافت: ۱۲ اردیبهشت ۸۹

چکیده

مقدمه: تزریق داخل صفاقی عصاره آبی گیاه شبم خورشید سبب القای بی دردی در هر دو مرحله آزمون فرمالین در موش های صحرایی می شود. القای بی دردی در مرحله حادث تحت کنترل فرایندهای مرکزی است و افزایش فعالیت هسته پاراژینگانتوسولولاریسی (PGi) که یکی از مراکز کنترل درد مرکزی است، نمادی از القای بی دردی است. اثر تجویز این عصاره بر سرعت شلیک نوروں های این هسته پس از القای درد فرمالین در موش های بیهوش در این پژوهش بررسی شد.

روش ها: با روش ثبت تک واحدی خارج سلولی سرعت شلیک نوروں های این هسته در ۲۰ سر موش صحرایی نر بیهوش شده با داروی اورتان در گروه های: شاهد، عصاره دروزرا و سدیم سالیسیلات (۳۰۰ mg/kg, i.p.) ثبت شد. فرمالین (۲٪) برای القای درد ۳۰ دقیقه پس از هر درمان به کف پای موش ها تزریق شده و از هسته مخالف تزریق ثبت گرفته شد. داده ها توسط آماری Wilcoxon تحلیل شدند.

یافته ها: تزریق عصاره (۰/۰۵ mg/kg, i.p.) در ۶۶/۶٪ از نوروں ها شلیک نوروںی را بطور معنی دار افزایش و در ۱۶/۶٪ آنها کاهش داد، ولی بر فعالیت ۱۶/۶٪ نوروں ها تاثیر معنی داری نداشت (p<۰/۰۰۱). در حالی که تجویز سدیم سالیسیلات سرعت شلیک نوروںی را در ۵۰٪ از نوروں ها بطور معنی دار کاهش داد (p<۰/۰۰۱).

نتیجه گیری: عصاره این گیاه می تواند با افزایش تعداد نوروں های با شلیک تشدید شده در هسته PGi و افزایش خروجی این هسته در ایجاد بی دردی نقش داشته باشد. اما سدیم سالیسیلات نمی تواند از سد خون- مغز عبور کند.

واژه های کلیدی: عصاره آبی گیاه دروزرا اسپاتولاتا- هسته پاراژینگانتوسولولاریسی- ثبت تک واحدی خارج سلولی- آزمون فرمالین- موش صحرایی

مقدمه

محیطی است. بنا به تعریف مؤسسه بین المللی درد "درد، یک حس ناخوشایند یا تجربه هیجانی مرتبط با ضایعه بافتی است" [۱]. بشر از دیر باز به روش های گوناگون به مبارزه با درد پرداخته و امروزه گیاهان دارویی و داروهای با منشأ گیاهی از مهم ترین داروهای کاهش دهنده درد محسوب می شوند

درد، یک پدیده چند بعدی متأثر از عوامل حسی، هیجانی و

Hassanpm@yahoo.com

www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

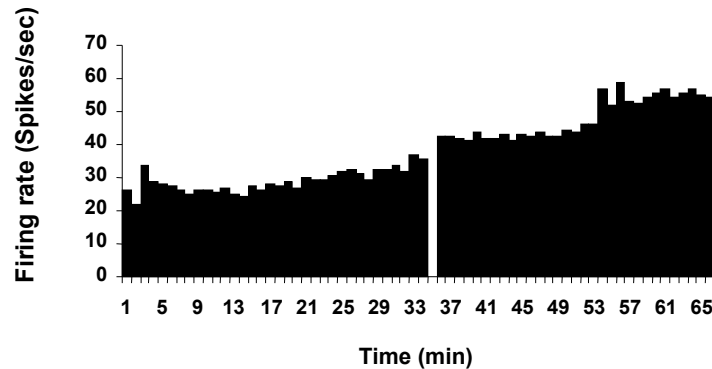
مواد و روشها

مطالعه بر روی ۲۰ سر موش صحرایی نر نژاد اسپراگ (Sprague) در محدوده وزنی ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم، تهیه شده از مؤسسه رازی انجام شد. حیوانات در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت تاریکی- ۱۲ ساعت روشنایی، دمای محیط ($22 \pm 1^\circ C$) و با دسترسی آزادانه به آب و غذا در قفس های جداگانه در گروه های ۴ و ۸ تایی نگهداری شدند. بساط ثبت تک واحدی خارج سلولی شامل: قفس فارادی، استرئو میکروسکوپ جراحی، آمپلی فایر مدل DAM 80 ساخت WPI کشور آمریکا، اوسیلوسکوپ، کامپیوتر مجهز به نرم افزار Cooledit نسخه ۲ جهت ثبت، نرم افزار موج بیز نوشته شده در گروه فیزیولوژی دانشگاه تربیت مدرس، دستگاه الکتروپولر عمودی و میکروالکتروود شیشه‌ای بود. پیش از ثبت، موش ها با تزریق داخل صفاقی اورتان به غلظت ۱/۵-۱/۲ گرم/کیلو گرم به صورت داخل صفاقی بیهوش می شدند [۱۰] سپس به کمک جراحی استریوتاکسی و با توجه به مختصات هسته PGI (جلو- عقب: ۱۱/۹-، طرفی: ۱/۶ ± و عمق: ۸/۶ میلی متر) بر اساس اطلس پاکسینوز [۲۵] حفره ای در سطح جمجمه برای ورود الکتروود ثبت تعبیه می شد. الکتروودهای شیشه ای ثبت به کمک میکروالکتروود پولر به گونه ای کشیده می شدند که دارای امپدانس در حدود ۱۰-۲۰ MΩ باشند. سپس این الکتروودها با محلول استات سدیم ۰/۵ مولار بعلاوه ۲٪ ترکیب رنگی Pontamine Sky Blue (PSB) پر می شدند. این محلول امکان تزریق رنگ به صورت ایونتوفورتیک را در پایان ثبت برای انجام تأیید بافت شناسی فراهم می آورد. سیگنال های حاصل از فعالیت نورون های هسته PGI بوسیله میکروالکتروود به آمپلی فایر منتقل و تا ۱۰۰۰ برابر تقویت شده و فرکانس های ۳۰۰ تا ۳ کیلوهرتز آن برای ثبت به کامپیوتر ارسال می شد. گروه های آزمایشی شامل: ۱- شاهد: این گروه شامل موش هایی بود که ابتدا به مدت ۱۵ دقیقه از نورون های هسته PGI آنها ثبت گرفته شده و سپس ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲٪ به عنوان محرک درد زا به کف پای مخالف هسته مورد ثبت تزریق می شد. ۲- گروه آزمون دریافت کننده عصاره آبی گیاه دروزرا: این گروه شامل موش هایی بود که پس از ۱۵ دقیقه ثبت اولیه، با عصاره دروزرا به غلظت ۰/۰۵

[۷]. گیاه دروزرا اسپاتولا (*Drosera spatulata*) یا شبنم خورشید از خانواده دروزراسه (Droseraceae) غیر بومی ایران است که در طب سنتی برای درمان مشکلاتی چون: درد استخوان، دردهای افزایش یابنده، مشکلات تنفسی، عوارض التهابی سرماخوردگی و سرفه های شدید مصرف می شده است [۱۲]. روش باز زایی گیاهی، تجربه مطالعه خواص درمانی برخی از گیاهان غیر بومی و نیز برخی دستکاری ها را بر مواد مؤثره این گیاهان را که در حالت طبیعی امکان پذیر نیست، برای پژوهشگران فراهم می آورد و از همین رو ما نیز به مطالعه اثرات این گیاه در شکل تراریخت آن پرداختیم. ما قبلاً گزارش کردیم که تجویز داخل صفاقی عصاره آبی بخش های هوایی گیاه باز زایی شده شبنم خورشید درد را در هر دو مرحله حاد و مزمن آزمون فرمالین در موش های صحرایی کاهش داد [۲]. مطالعات فیتوشیمیایی نشان داده اند که این گیاه دارای انواع مختلفی از فلاونوئیدها است [۲۰]. فلاونوئیدها ضمن اینکه نقش مهمی در سرکوب فرآیندهای التهابی بازی می کنند [۲۳]، می توانند از سد خون- مغز نیز عبور کنند [۲۴].

با توجه به اینکه گزارش شده ترکیباتی که سبب کاهش درد در مرحله اول آزمون فرمالین می شوند، اثرات خود را بصورت مرکزی و از طریق مسیر نزولی کنترل درد اعمال می کنند [۴] و اینکه هسته PGI یکی از خروجی های مهم شبکه نزولی مهار درد است [۳۱ و ۲۹]، این فرضیه مطرح می شود که آیا فعال شدن سیستم نزولی کنترل درد از طریق فعال کردن این هسته می تواند در اثر کاهش دهنده درد این عصاره نقشی داشته باشد یا نه؟ لذا، در این تحقیق با بکار گیری روش الکتروفیزیولوژیک ثبت تک واحدی خارج سلولی تأثیر تجویز داخل صفاقی عصاره این گیاه بر سرعت شلیک نورون های هسته PGI القا شده توسط تجویز فرمالین به کف پای مخالف هسته، مورد بررسی قرار گرفت.

سدیم سالیسیلات داروی ضد التهابی غیر استروئیدی است که با مهار آنزیم سیکلواکسیژناز باعث کاهش درد می شود [۸] که بر اساس نتایج آزمون فرمالین، هیچ اثر کاهش دهنده مرکزی بر فرآیند درد حاد ندارد و لذا ما این دارو را در این آزمایش به عنوان یک داروی کاهش دهنده درد بدون اثرات مرکزی انتخاب کردیم [۲۲ و ۴].



شکل ۱- نمونه ای از PSTH ثبت شده از هسته PGI که در آن میانگین فعالیت پایه نرونی ۴ نورون (سمت چپ) و افزایش این فعالیت (سمت راست) به دنبال تزریق فرمالین به کف پای مخالف هسته مورد ثبت در گروهی که دوز مؤثر بر درد عصاره را دریافت کرده بودند نشان داده شده است.

عمل) یا فرکانس شلیک نرونی در واحد زمان (ثانیه) استخراج و به شکل PSTH (pre-stimulus time histogram) ترسیم می شدند، شکل (۱). سپس تغییر در فرکانس شلیک نورون ها نسبت به حالت پایه در نورون های گروه های مختلف محاسبه می شد. با استناد به مقاله محقق بنام Kanda و همکاران چاپ شده در سال ۱۹۹۹ تغییر در سرعت شلیک نرونی هریک از نورون های یک هسته ملاکی از تغییر در خروجی کل آن هسته است [۱۶]. در اینجا افزایش در شلیک نورون های هسته PGI بعنوان افزایش خروجی سیستم نزولی کنترل کننده درد ارسال شده از هسته PGI به سطح نخاعی تعبیر می شود. بر اساس یافته های الکتروفیزیولوژیک به دنبال هر کدام از دستکاری های صورت گرفته در این آزمایش سه نوع پاسخ در نورون های هسته PGI مشاهده شد (جدول ۱).

بحث

با توجه به نظریه Kanda افزایش فعالیت نرونی مشاهده شده در ثبت تک واحدی از نورون های هر هسته ای می تواند ملاکی برای افزایش خروجی آن هسته باشد. همچنین این دانشمند مدعی است که بین این افزایش خروجی و افزایش مهار نزولی درد رابطه مستقیمی وجود دارد. با توجه به این اصل که افزایش در فعالیت تک واحدی نورون ها را می توان به عنوان خروجی یک شبکه در نظر گرفت [۱۶] و هسته PGI از خروجی های مهم شبکه مهار کننده نزولی درد می باشد [۵]، البته لازم به ذکر است که ما در این پژوهش فقط پاسخ

میلی گرم/ کیلوگرم وزن بدن بصورت داخل صفاقی پیش درمانی شده و پس از ۳۰ دقیقه ثبت از نورون های هسته PGI آنها، فرمالین به کف پای سمت مخالف هسته تزریق شده و برای بررسی اثر آن به مدت ۳۰ دقیقه دیگر از آنها ثبت گرفته می شد. ۳- گروه آزمون دریافت کننده سدیم سالیسیلات (۳۰۰ mg/kg, i.p.): روش کار در این گروه مشابه با گروه دوم بود با این تفاوت که به جای دریافت عصاره، سدیم سالیسیلات با غلظت ۳۰۰ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن بصورت داخل صفاقی به این موش ها تجویز می شد. در پایان هر ثبت، توسط روش تزریق ایوتوفورتیک (تزریق توسط جریان الکتریکی)، رنگ حیاتی PSB به داخل هسته ی PGI تزریق می شد. سپس حیوانات با محلول بافر فسفات ۱۰ درصد به صورت داخل قلبی پرفیوژیون می شدند. برش بافت مغزی پس از مراحل بافت شناسی از موقعیت PGI تهیه و در صورت تأیید بافتی، تحلیل آماری اطلاعات شلیک نرونی بر روی داده ها توسط آزمون آماری Wilcoxon صورت می گرفت. پس از تعیین سرعت شلیک نرونی در هریک از نورون ها درصد تغییرات در شلیک نرونی بر اساس این فرمول محاسبه شد:

$100 \times \frac{\text{تعداد کل نورون ها} - \text{تعداد نورون های با تغییر مشابه در شلیک نرونی}}{\text{تعداد کل نورون های با تغییر مشابه در شلیک نرونی}} = \text{درصد نورون هایی که شلیک آنها تغییر کرده است}$

یافته ها

ابتدا نتایج به صورت تعداد شلیک ها (تعداد پتانسیل های

جدول ۱- میزان تغییر در شلیک نورونی نسبت به حالت پایه در نورون های هسته PGi بر حسب درصدی از تعداد کل نورون های مورد ثبت بدنال هریک از دستکارهای خاص در هر کدام از گروه ها

تغییر در سرعت شلیک نورونی (Firing rate) در مقایسه با شلیک پایه			گروه های آزمایشی
درصد نورون های بدون تغییر در پاسخ	درصد نورون های با پاسخ کاهشی	درصد نورون های با پاسخ افزایشی	
۵۰٪	۳۷/۵٪ ***	۱۲/۵٪	گروه کنترل (۸ نورون در ۸ سر موش)
۱۶/۶٪	۱۶/۶٪	۶۶/۶٪ ***	گروه دریافت کننده داخل صفاقی دوز ۰/۰۵ mg/kg عصاره آبی گیاه (۶ نورون در ۶ سر موش)
۱۶/۶٪	۵۰٪	۱۶/۶٪	گروه دریافت کننده داخل صفاقی دوز ۳۰۰ mg/kg سدیم سالیسیلات (۶ نورون در ۶ سر موش)

*** تفاوت معنی دار (p<۰/۰۰۱). نسبت به ثبت پایه

سد خون- مغز عبور کنند [۲۴]. این فلاونوئیدها می توانند بواسطه مکانیسم های مختلفی از جمله اثر بر گیرنده های GABA_A [۳۰ و ۲۱ و ۱۳ و ۶]، تأثیر بر گیرنده های اپیوئیدی [۲۶ و ۱۹]، اثر بر گیرنده های آلفا دو- آدرنژیک [۱۷] و مهار آنزیم های درگیر در التهاب در مغز [۱۳ و ۳]، درد را به صورت مرکزی کنترل کنند. در این ارتباط، مطالعات وجود گیرنده های GABA_A را با توزیع گسترده در نواحی مختلف سیستم اعصاب [۳۲] از جمله، RVLN که هسته PGi به عنوان یکی از هسته های کنترل کننده مرکزی درد نیز جزئی از آن است نشان داده است [۱۵ و ۱۴]. حضور گیرنده های اپیوئیدی [۳۱] و گیرنده آلفا دو- آدرنژیک [۱] نیز در این هسته گزارش شده است چون با تحریک گیرنده های GABA_A [۳۲]، گیرنده های اپیوئیدی [۲۹ و ۲۸] و گیرنده های آلفا دو- آدرنژیک [۱۸] منجر به بی دردی می شود. بعنوان یک نتیجه نهائی اینطور پیشنهاد می شود که عصاره آبی گیاه دروزرا اسپاتولاتا، حاوی ترکیبات مؤثره ای (احتمالاً) فلاونوئیدها) است که حداقل بخشی از اثرات بی دردی مرکزی خود را با واسطه هسته PGi اعمال می کند.

سپاسگزاری

بدینوسیله و از صمیم قلب از زحمات استاد ارجمند جناب آقای دکتر سعید سمنانیان و همکاری تمامی اعضای گروه فیزیولوژی دانشگاه تربیت مدرس که ما را در انجام این تحقیق یاری دادند، سپاسگزاری می کنم.

نورون های پاسخگو به درد، یعنی نورون هایی که شلیک آنها پس از هر یک از دستکاری ها دچار تغییر می شود را ملاک قرار داده و آنها را در فعالیت سیستم نزولی کنترل درد از طریق هسته PGi در نظر گرفتیم. یافته ما از ثبت فعالیت نورون های هسته PGi در گروه کنترل نشان داد که بدنال تجویز فرمالین ۱۲/۶٪ از کل نورون ها افزایش میزان فعالیت و ۳۷/۵٪ از آنها کاهش در فعالیت را نسبت به حالت پایه نشان می دهند. اما پیش درمانی بصورت تجویز داخل صفاقی دوز مؤثر عصاره آبی گیاه دروزرا اسپاتولاتا سبب شد تا ۶۶/۶٪ از نورونهای مورد ثبت افزایش و ۱۶/۶٪ از آنها کاهش در میزان فعالیت پایه را نشان دهند. بدین ترتیب، هسته PGi حیوانی که عصاره را دریافت کرده است در مقایسه با حیوان کنترل دارای برونده تحریکی بیشتری بوده و لذا مهار نزولی بیشتری را بر سطح نخاع اعمال می کند. نتایج ثبت انجام شده از گروه دریافت کننده سدیم سالیسیلات (۳۰۰ mg/kg, i.p.) در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی داری را نشان نمی دهد که دال بر عدم وجود اثر بی دردی مرکزی برای سدیم سالیسیلات از طریق هسته PGi است. با توجه به اینکه عصاره مورد آزمایش در این پژوهش از نوع آبی است این سؤال مطرح می شود که کدام دسته از مواد مؤثره این عصاره احتمالاً با عبور از سد خون- مغز توانسته اند عامل بروز این اثرات باشند؟ در این رابطه باید گفت که مطالعات قبلی نشان داده اند، فلاونوئیدها عمده ترین ترکیب موجود در عصاره آبی این گیاه هستند که جزء ترکیبات پلی فنولیک محسوب می شوند [۹]. فلاونوئیدها می توانند از

References

- [1] Fathi Moghaddam H, Kesmati M, Mohammadpour Kargar H, The effect of clonidine administration into lateral paragigantocellularis on morphine withdrawal in morphine dependent male rats. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2 (1) 1381 52-60.
- [2] Golabi S, Hassanpour-Ezatti M, Azhdari H, Rohampour K, Radjabian T, Ekhetraie Tousi S, Anti-nociceptive activity of regenerated *Drosera spatulata* aqueous extract by rat formalin test. *J Med Plants* 33 (2010) 35-40.
- [3] Ahmadiani A, Fereidoni M, Semnanian S, Kamalinejad M, Saremi S, Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Sambucus ebulus* rhizome extract in rat. *J Ethnopharmacol* 61(1998) 229-35.
- [4] Ahmadiani A, Javan M, Semnanian S, Barat E, Kamalinejad M, Anti-inflammatory and antipyretic effects of *Trigonella foenum-graecum* leaves extract in the rat. *J Ethnopharmacol* 75 (2001) 283-6.
- [5] Azami J, Llewlyn MB, Roberts MHT, The contribution of nucleus reticularisparagigantocellularis and nucleus raphe magnus to the analgesia produced by systemically administered morphine, investigated with the microinjection technique. *Pain* 12 (1982) 229-246. Cited in: Taguchi K, Kato M, Kikuta J, Abe K, Chikuma T, Utsunomiya I, Miyatake T, The effects of morphine-induced increases in extracellular acetylcholine levels in the rostral ventrolateral medulla of rat. *J Pharmacol Exp Ther* 289 (1999) 1539-1544.
- [6] Belinda JH, Chebib M, Hanrahan RJ, Johnston RAG, (our suggestion: Hall BJ, Chebib M, Hanrahan JR, Johnston GA) Flumazenil-independent positive modulation of γ -aminobutyric acid action by 6-methylflavone at human recombinant $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$ and $\alpha 1\beta 2GABAA$ receptors. *Eur J Pharmacol* 491 (2004) 1-8.
- [7] Calixto JB, Scheidt C, Otuki M, Santos AR, Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. *Expert Opin Emerg Drugs* 6 (2001) 261-79.
- [8] Cashman J, Mcanulty G, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in perisurgical pain Management: mechanisms of action and rationale for optimum use. *Drugs* 49 (1995) 51-70.
- [9] Cook NC, Samman S, Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources *J Nutr Biochem* 7 (1996) 66-76.
- [10] Carev M, Valic M, Pecotic R, Karanovic N, Valic Z, Pavlinac I, Dogas Z, Propofol abolished the phrenic long-term facilitation in rats. *Respir Physiol Neurobiol* 170 (2010) 83-90.
- [11] Cross SA, Pathophysiology of pain. *Mayo Clin Proc* 69 (1981) (our suggestion: 1994) 375-383.
- [12] Duke JA, Handbook of medicinal herbs. Florida: CRC Press Inc, 1989, p: 257.
- [13] Fernández PS, Wasowski C, Loscalzo ML, Granger ER, Johnston ARG, Paladini CA, Marder M, Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. *Eur J Pharmacol* 539 (2006) 168-76.
- [14] Fields HL, Basbaum AI, Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: Wall PD, Melzack R, editors, Textbook of Pain. London: Churchill Livingstone, 1999.
- [15] Foley MC, Stanton JJ, Pricea ME, Cunningham TJ, Hassera ME, Heescha MC, GABAA 1 and 2 receptor subunit expression in rostral ventrolateral medulla in nonpregnant and pregnant rats. *Brain Res* 975 (2003) 196-206.
- [16] Kanda T, Ohta Y, Kida A, Kemmotsu O, The effect of alpha2-adrenergic drugs on the activity of neurons in the rat nucleus raphe magnus in vitro. *Anesth. Analg.* 88(1999) 459-61.
- [17] Kweon YK, Soo JC, Hyuk JJ, Dong CZ, Pawan KSh, Shankar PP, et al. Epigallocatechin gallate inhibits the pacemaker activity of interstitial cells of cajal of mouse small intestine. *Korean J Physiol Pharmacol* 2008; 12:111-115.
- [18] Lebars D, Gozariu M, Cadden SW, Animal models of nociception. *Pharmacol Rev* (2001) 597-652. 53
- [19] Loscalzo ML, Wasowski C, Paladini CA, Marder M, Opioid receptors are involved in the sedative and antinociceptive effects of hesperidin as well as in its potentiation with benzodiazepines. *Eur J Pharmacol* 77 (2007) 399-404.
- [20] Marczak L, Kawiak A, Lojkowska E, Stobiecki M, Secondary metabolites in in vitro cultured plants of the genus *Drosera*. *Phytochemical Anal* 16 (2005) 143-9.
- [21] Medina JH, Viola H, Wolfman C, Marder M, Wasowski C, Calvo D, Paladini AC, Flavonoids: a new family of benzodiazepine receptor ligands. *J Comp Neurol* 22 (2004) 419-25.

- [22] Naik VR, Agshikar NV, Abraham GJ, Analgesic and anti-inflammatory activity in alcoholic extracts of *Cucumis trigonus Roxburghii*. A preliminary communication. *Pharmacol* 20(1980) 52-60.
- [23] Packer L, Midori H, Antioxidant food supplements in human health. San Diego: Academic press, 1999.
- [24] Paper DH, Karall E, Kremser M, Krenn L, Comparison of the anti-inflammatory effects of *Drosera rotundifolia* and *Drosera madagascariensis* in the HET-CAM assay. *Phytotherapy Res* 19 (2005) 323-6.
- [25] Paxinos G, Watson C, The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. San Diego: Academic Press. 1998
- [26] Peter L, Katavic KL, Hernan N, Thomas EP, Flavonoids as opioid receptor ligands: identification and preliminary structure– activity relationships. *J Nat Prod* 70(2007) 1278–82.
- [27] Saad B, Azaizeh H, Said o, Tradition and perspectives of arab herbal medicine: a review. *Evid- Base Compl Alt* 4 (2005) 475-479
- [28] Taguchi K, Kato M, Kikuta J, Abe K, Chikuma T, Utsunomiya I, Miyatake T, The effects of morphine-induced increases in extracellular acetylcholine levels in the rostral ventrolateral medulla of rat. *J Pharmacol Exp Ther* 289 (1999) 1539–1544.
- [29] Takagi H, The nucleus reticularis paragigantocellularis as a site of analgesic action morphine and enkephalin. *Trends Pharmacol Sci* 1 (1980) 182-4.
- [30] Williams JR, Spencer EPJ, Rice-Evans C, Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med* 36 (2004) 838-49.
- [31] Willis WD, Westlund KN, Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *J Clin Neurophysiol* 14 (1997) 2-31.
- [32] Young, Anne B, Chu, Dorothy CM, Distribution of GABA A and GABA B receptors in mammalian brain: Potential targets for drug development. *Drug Dev Res* 21 (1990) 161-7.