Journal of Military Medicine
2024, Volume 25, Issue 6
Pages: 2110-2119
10.30491/JMM.2023.1006544.1091

Preparation of Oral Emulsion of *Valeriana officinalis* Hydro-Alcoholic Extract and Comparison of its Analgesic and Anti-Anxiety Effects with Valerian Extract in Adult Male Wistar Rats

Ali Farokhi [1], Mahdi Saberi [2], Zahra Bahari [3], Zohreh Jangravi [4], Maryam Iman [1*]

[1] *Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[2] *Department of Pharmacology & Toxicology, Faculty of Pharmacy, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[3] *Department of Physiology, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[4] *Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

Received: 1 October 2023 **Accepted:** 20 December 2023

Abstract

Background and Aim: Chronic neuropathic pain is one of the common and debilitating problems of human societies and is a challenge in health care *Valerian officinalis* has been used in the treatment of pain and anxiety due to its antioxidant effects and multiple mechanisms. Also, the medicinal form of emulsion is studied to increase the bioavailability and absorption of herbal products. The present study was conducted to determine the analgesic and anti-anxiety effects of the oral emulsion of the extract and compare it with the effects of the extract in adult male rats.

Methods: First, the oral emulsion of the extract was formulated with the help of similar studies and Design Expert software, and the best formulation was selected. Then, neuropathic pain was induced in the animals with the help of a sciatic nerve chronic obstructive lesion (CCI) neuropathy surgical model. The extract and emulsion were given orally (gastric gavage) to the animals for 30 days, after which behavioral tests were performed, to investigate thermal allodynia, and elevated plus maze (EPM), to investigate induced anxiety behaviors, one day before Induction of neuropathy and on days 2, 4, 6, 10, 14, 21, 30 after neuropathy were investigated, and at the end, the effects of oral emulsion gavage of extract and extract on lipid peroxidation of malondialdehyde (MDA) in brain tissue were investigated and compared.

Results: Separate administration of valerian extract and emulsion reduced cold allodynia in all days after CCI surgery compared to the neuropathy group (P<0.05). In addition, CCI surgery caused anxiety in rats. Administration of valerian emulsion and its extract were able to significantly reduce anxiety in the behavioral test of the plus-shaped elevated maze. The difference is that this reduction process started earlier with the administration of the extract emulsion (P<0.001). Also, the administration of the extract and emulsion significantly reduced the amount of malondialdehyde in the brain tissue in neuropathic rats compared to the neuropathy group (P<0.001), with the difference that the emulsion of the extract caused a greater decrease in the amount of malondialdehyde compared to the extract.

Conclusion: Valerian extract and emulsion have analgesic and anti-anxiety effects. In addition, the administration of valerian emulsion in neuropathic rats has significantly more anti-anxiety and analgesic effects compared to the administration of valerian extract.

Keywords: Neuropathic Pain, Emulsion, Allodynia, Valeriana Officinalis, Glutathione.

*Corresponding author: **Maryam Iman,** Email: iman1359@yahoo. com

مجله طب نظامی
دوره ۲۵، شماره ۶، بهمن و اسفند ۱۴۰۲
صفحات: ۲۱۱۹-۲۱۱۰
10.30491/JMM.2023.1006544.1091

تهیه امولسیون خوراکی عصاره هیدروالکلی سنبل‌الطیب و مقایسه اثرات ضد دردی و ضد اضطرابی آن با عصاره در موش صحرایی بالغ نر نژاد ویستار

علی فرخی[۱]، مهدی صابری[۲]، زهرا بهاری[۳]، زهره جنگروی[۴]، مریم ایمان[۱*]

[۱] گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران
[۲] گروه فارماکولوژی و سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران
[۳] گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران
[۴] گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: درد مزمن نوروپاتیک یکی از مشکلات شایع و ناتوان کننده جوامع بشری‌است و در مراقبت‌های بهداشتی چالش بر انگیزاست. گیاه سنبل‌الطیب (*Valeriana officinalis*) از گذشته تا کنون، به دلیل اثرات آنتی اکسیدانی و مکانیسم‌های متعددش، در درمان درد و اضطراب کاربرد داشته است. همچنین شکل دارویی امولسیون نیز در افزایش فراهمی‌زیستی و جذب فرآورده‌های گیاهی مورد مطالعه‌است. مطالعه حاضر با هدف تعیین اثرات ضددردی و ضداضطرابی امولسیون خوراکی عصاره و مقایسه آن با اثرات عصاره در موش صحرایی بالغ نر صورت گرفت.

روش‌ها: ابتدا امولسیون خوراکی عصاره به کمک مطالعات مشابه و نرم‌افزار Design Expert فرموله شد و بهترین فرمولاسیون انتخاب گردید. سپس درد نوروپاتیک به کمک مدل جراحی نوروپاتی ضایعه انسدادی مزمن عصب سیاتیک (CCI) در حیوان القا گشت. عصاره و امولسیون به صورت خوراکی (گاواژ معدی) به مدت ۳۰ روز به حیوانات داده شدند، پس ازآن تست‌های رفتاری استن، جهت بررسی آلودینیای حرارتی، و ماز مرتفع بعلاوه‌ای شکل (EPM)، جهت بررسی رفتارهای اضطرابی القایی، در یک روز قبل از القای نوروپاتی و نیز در روزهای ۲، ۴، ۶، ۱۰، ۱۴، ۲۱، ۳۰ بعد از نوروپاتی بررسی شدند، همچنین در انتها سنجش اثرات گاواژ امولسیون خوراکی عصاره و عصاره بر پراکسیداسیون لیپید مالون‌دی‌آلدئید (MDA) در بافت مغز مورد بررسی و مقایسه قرارگرفت.

یافته‌ها: تجویز جداگانه عصاره و امولسیون سنبل‌الطیب سبب کاهش آلودینیای سرد در تمام روزهای پس از جراحی CCI در مقایسه با گروه نوروپاتی شدند ($P<۰/۰۵$). علاوه بر این، جراحی CCI سبب ایجاد اضطراب در موش‌ها شد. که تجویز امولسیون سنبل‌الطیب و عصاره آن توانست به طور معنی‌داری سبب کاهش اضطراب در تست رفتاری ماز مرتفع به‌علاوه ای شکل شود. با این تفاوت که با تجویز امولسیون عصاره این روند کاهشی زودتر شروع شد ($P<۰/۰۰۱$). همچنین تجویز عصاره و امولسیون به طور معنی‌داری میزان مالون‌دی‌آلدئید را در بافت مغز را در موش‌های نوروپاتیک در مقایسه با گروه نوروپاتی کاهش دادند ($P<۰/۰۰۱$) ، با این تفاوت که امولسیون عصاره باعث کاهش بیشتر میزان مالون‌دی‌آلدئید، نسبت به عصاره گردید.

نتیجه‌گیری: عصاره و امولسیون سنبل‌الطیب دارای اثرات ضددردی و ضداضطرابی هستند. علاوه براین، تجویز امولسیون سنبل‌الطیب در موش‌های نوروپاتیک به طور معنی‌داری اثرات ضداضطرابی و ضددردی بیشتری در مقایسه با تجویز عصاره سنبل‌الطیب، دارد.

کلیدواژه‌ها: درد نوروپاتیک، امولسیون، آلودینیا، سنبل الطیب، گلوتاتیون.

*نویسنده مسئول: **مریم ایمان.** پست الکترونیک: iman1359@yahoo. com
دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۰۷/۰۹ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۰۹/۲۹

مقدمه

در چرخه درمان، به ندرت داروها به تنهایی تجویز می‌گردند، بلکه همراه با اکسپیان‌ها (excipient) در شکل دارویی مصرف می‌شوند و یکی از رایج‌ترین راه‌های تجویز داروها، از راه خوراکی می‌باشد، که می‌توان فراورده‌های گیاهی را نیز در اشکال دارویی، تنتور و یا امولسیون مورداستفاده قرار داد. توجه به این نکته که دردهای مزمن و نوروپاتی در اثر آسیب یا اختلال در عملکرد سیستم عصبی ایجاد می‌شوند و امروزه افراد زیادی از این بیماری رنج می‌برند نیز حائز اهمیت است (۱) و نیز درد خودبه‌خودی، پاسخ افزایش‌یافته به محرک‌های دردزا (هایپرآلژزیا) و پاسخ دردناک به محرک‌های غیر دردزا (آلودینیا) و اختلالات سایکولوژی از قبیل اضطراب، از علائم درد نوروپاتیک (neuropathic pain) است (۲). همچنین درد مزمن معمولاً به دلیل عدم پاسخ ضددردهای رایج، زندگی بیمار را مختل می‌کند (۳). امروزه، داروهای مختلفی از قبیل اوپیوئیدها، ضدافسردگی‌های سه حلقه‌ای، مسدودکننده‌های کانال سدیم، گاباپنتین‌ها و بلاکرهای کانال‌های NMDA در درمان دردهای نوروپاتی‌استفاده می‌شوند، ولی هنوز درمان پیشگیری کننده و قطعی برای این بیماران وجود ندارد (۴). در پژوهش‌ها نشان داده شده است که استفاده از آنتی اکسیدان‌ها قادر به کاهش صدمات ناشی از استرس اکسیداتیو و ایجاد تعادل ردوکس در بیماران است. بنابراین بررسی تاثیر آنتی اکسیدان‌ها در تسکین دردهای مزمن نیز حائز اهمیت می‌باشد (۲). قرن‌هاست که فرهنگ‌های گوناگون از ترکیبات گیاهی با اثر آنتی‌اکسیدانی برای درمان تعداد زیادی از بیماری‌ها استفاده می‌کنند. گیاه سنبل‌الطیب (*Valeriana officinalis*) نیز از ترکیبات گیاهی است که امروزه مطالعات زیادی در زمینه اثرات آنتی‌اکسیدانی آن در بدن در حال انجام است و ضرورت انجام این پژوهش نسبت به سایر مطالعات انجام گرفته مشابه، استفاده از این آنتی‌اکسیدان گیاهی (۴،۵) در شکل دارویی امولسیون برای ایجاد فراهم زیستی بالاتر (۶،۷) و به دنبال آن جذب بیشتر ماده مؤثره موجود در عصاره و فراهم نمودن یک شکل دارویی خوراکی نو و کاربردی‌تر در درمان دردهای نوروپاتیک و اضطراب بوده است (۱۹-۸).

روش‌ها

تهیه امولسیون خوراکی عصاره هیدروالکلی سنبل الطیب

مواد مورد نیاز جهت تهیه امولسیون خوراکی عصاره شامل، روغن زیتون خریداری شده از شرکت اتکا-ایران، به عنوان فاز روغنی (همچنین اولئیک اسید خریداری شده از شرکت مرک آلمان)، آب دیونیزه، توییین ۸۰ و اسپان ۲۰ خریداری شده از شرکت مرک آلمان (و در بعضی فرمولاسیون‌ها لستین) به عنوان عوامل امولسیون کننده، سدیم بنزوات به عنوان ماده نگهدارنده و عصاره هیدروالکلی سنبل‌الطیب خریداری شده از شرکت زردبند- ایران، به عنوان داروی مورد مطالعه بودند، که در ابتدا با استفاده از مطالعات آزمایشگاهی (Pilot) و به دست آوردن دز تجویزی عصاره که به میزان ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن موش بود و همچنین طراحی آزمایشات اولیه تهیه فرمولاسیون‌های مختلف امولسیون عصاره، بر اساس درصدهای متفاوت حضور هریک از اجزای متغیر امولسیون (امولسی فایرها)، به کمک نرم‌افزار Design Expert وهمچنین با توجه به HLB مورد نیاز (تعادل آبدوست- چربی-دوست) برای ایجاد امولسیون خوراکی روغن درآب که حدوداً بین اعداد ۸ تا ۱۸ می‌باشد و از طریق محاسبات فرمولی آن، بازه درصدی امولسی فایرهای مورد نیاز (سورفکتانت‌ها) توییین ۸۰ و اسپان ۲۰، به دست آمد، که بدین شرح محاسبه شدند: توییین ۸۰ بین ۲۱ تا ۳۳ درصد و اسپان ۲۰ بین ۶۷ تا ۷۹ درصد و با قرار دادن این مقادیر در نرم‌افزار Design expert نیز، آزمایشات متعددی بر اساس درصدهای مختلف متغیرها برای تهیه فرمولاسیون‌ها ارایه گردید. در ابتدا چندین فرمولاسیون به عنوان نمونه تهیه گشت، سپس فرمولاسیون‌های متفاوت از درصدهای مختلف امولسی فایرها تهیه شدند و در انتها بر اساس خصوصیات فیزیکوشیمیایی، ظاهر، درصد کپسوله شدن دارو در قطرک‌ها و پایداری آن‌ها، بهترین فرمولاسیون انتخاب شد که F۱۳ امولسیون فرموله شده نهایی بود. (جدول ۱) به این صورت که، در یک بشر مقادیر روغن، عصاره و اسپان ۲۰ (در تعدادی از فرمولاسیون‌ها لستین) اندازه‌گیری و اضافه شد. همزمان در بشر دیگری مقادیر آب، توییین ۸۰ و سدیم بنزوات نیز اندازه‌گیری و اضافه گردید. سپس به وسیله مگنت هر دو بشر روی دستگاه‌های جداگانه هیتراستیرر قرار گرفتند و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴ شروع به همزدن کردند، با این تفاوت که بشر حاوی آب و توییین ۸۰ و سدیم بنزوات به دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد رسید و پس از هم زدن و کمی‌نزدیک شدن به دمای محیط محتویات آن به بشر حاوی روغن که همچنان هم میخورد اضافه شد، که بعداز آن یک محلول شیری رنگ به دست آمد. بعد از اتمام این مراحل، محتویات به دست آمده سه دور در دستگاه هموژنایزر هموژن شدند (هر بار به مدت ۱ دقیقه با دور ۶) و در نهایت امولسیون به دست آمده در یک فالکون ۱۰ میلی‌لیتری ریخته شد و در دمای محیط نگهداری شد، تا تست‌های پایداری انجام گیرد. در نهایت، طبق جدول ۱ فرمولاسیون F۱۳ به عنوان بهترین فرمولاسیون، به میزان لازم جهت تجویز به حیوان، تهیه گشت. پس از تهیه امولسیون، هم عصاره و هم امولسیون عصاره، طبق دز تجویزی، به طور جداگانه به حیوانات گاواژ شدند.

روش بررسی نوع و پایداری امولسیون

ابتدا به وسیله حل کردن رنگ محلول در آب در امولسیون و مشاهده آن در زیر میکروسکوپ مشاهده شد که رنگ در فاز پیوسته حل شده و در قطرک‌ها حل نشده است، در نتیجه امولسیون تهیه شده یک امولسیون روغن در آب بود. سپس با بررسی آن در زیر میکروسکوپ نوری و اندازه‌گیری قطر قطرک‌ها مشاهده گردید که

جدول-۱. مقادیر فرمولاسیون‌های نهایی پیشنهادی Design Expert با HLB مورد نظر

شماره فرمولاسیون	فاز روغنی (روغن زیتون)	عصاره سنبل‌الطیب	فاز آبی	توین ۸۰	اسپان ۲۰	سدیم بنزوات
F۱	٪۳۰	٪۱۰	٪۵۱	٪۱	٪۸	-
F۲	٪۳۰	٪۱۰	٪۵۷	٪۱	٪۱	٪۱ (لستین)
F۳	٪۳۰	٪۱۰	٪۵۳	٪۱	٪۵	٪۱ (لستین)
F۴	٪۳۰	٪۱۰	٪۵۷/۸	٪۱	٪۱	٪۰/۰۲
F۵	٪۳۰	٪۱۰	٪۳۸/۸	٪۱	٪۲۰	٪۰/۰۲
F۶	٪۳۰	٪۱۰	٪۵۳/۸	٪۵	٪۱	٪۰/۰۲
F۷	٪۳۰	٪۱۰	٪۳۴/۸	٪۵	٪۸	٪۰/۰۲
F۸	٪۳۰	٪۱۰	٪۵۵/۸	٪۳	٪۱	٪۰/۰۲
F۹	٪۳۰	٪۱۰	٪۳۶/۸	٪۳	٪۸	٪۰/۰۲
F۱۰	٪۳۰	٪۱۰	٪۳۶/۸	٪۵	٪۸	٪۰/۰۲
F۱۱	٪۳۰	٪۱۰	٪۵۱/۸	٪۴	٪۴	٪۰/۰۲
F۱۲	٪۳۰	٪۱۰	٪۴۹/۸	٪۲	٪۸	٪۰/۰۲
F۱۳	٪۳۰	٪۱۰	٪۵۷/۸	٪۱	٪۱	٪۰/۰۲
F۱۴	٪۳۰	٪۱۰	٪۳۴/۸	٪۵	٪۲۰	٪۰/۰۲
F۱۵	٪۳۰	٪۱۰	٪۴۹/۸	٪۲	٪۸	٪۰/۰۲
F۱۶	٪۳۰	٪۱۰	٪۴۹/۸	٪۲	٪۸	٪۰/۰۲
F۱۷	٪۳۰	٪۱۰	٪۴۹/۸	٪۲	٪۸	٪۰/۰۲
F۱۸	٪۳۰ (اولئیک اسید)	٪۱۰	٪۵۱/۸	٪۴	٪۴	٪۰/۰۲
F۱۹	٪۳۰ (اولئیک اسید)	٪۱۰	٪۴۹/۸	٪۲	٪۸	٪۰/۰۲
F۲۰	٪۳۰ (اولئیک اسید)	٪۱۰	٪۵۷/۸	٪۱	٪۱	٪۰/۰۲
F۲۱	٪۳۰ (اولئیک اسید)	٪۱۰	٪۳۴/۸	٪۵	٪۲۰	٪۰/۰۲
F۲۲	٪۳۰ (اولئیک اسید)	٪۱۰	٪۴۹/۸	٪۲	٪۸	٪۰/۰۲
F۲۳	٪۳۰ (اولئیک اسید)	٪۱۰	٪۴۹/۸	٪۲	٪۸	٪۰/۰۲
F۲۴	٪۳۰ (اولئیک اسید)	٪۱۰	٪۵۰/۸	٪۱	٪۸	٪۰/۰۲
F۲۵	٪۳۰ (اولئیک اسید)	٪۱۰	٪۵۶/۸	٪۲	٪۱	٪۰/۰۲
F۲۶	٪۳۰ (اولئیک اسید)	٪۱۰	٪۵۶/۸	٪۲	٪۱	٪۰/۰۲
F۲۷	٪۳۰ (اولئیک اسید)	٪۱۰	٪۵۷/۳	٪۱/۵	٪۱	٪۰/۰۲
F۲۸	٪۳۰ (اولئیک اسید)	٪۱۰	٪۵۷/۳	٪۱/۵	٪۱	٪۰/۰۲
F۲۹	٪۳۰ (اولئیک اسید)	٪۱۰	٪۵۰/۳	٪۱/۵	٪۸	٪۰/۰۲
F۳۰	٪۳۰ (اولئیک اسید)	٪۱۰	٪۵۰/۳	٪۱/۵	٪۸	٪۰/۰۲

سایز قطرک‌ها بین ۱۰ تا ۳۰ میکرون بوده، که نشان‌دهنده این بود که نوع امولسیون یک ماکروامولسیون بوده است و توزیع مناسبی در فاز پیوسته امولسیون داشته است. همچنین pH امولسیون به وسیله pH سنج اندازه‌گیری شد که مقدار مناسبی (حدود ۶) بود. در نهایت برای بررسی و پایش پایداری نمونه تهیه شده در طی مراحل طرح و پس از آن، هنگام تهیه امولسیون موارد زیر مورد سنجش قرار گرفتند و نتایج آن ثبت گردید که نوع امولسیون: روغن در آب (W/O)، ظاهر و شکل (رنگ و کدورت) امولسیون: شیری رنگ و کدر، سایز قطرک‌های امولسیون: بین ۳۰-۱۰ میکرون، پراکندگی مناسب و در نهایت pH امولسیون: حدود ۶ ثبت گردید.

گروه‌های آزمایشی پژوهش

حیوانات به‌طور تصادفی، در چهارگروه آزمایشی شش تایی توزیع شدند، گروه ۱: گروه شم (در این گروه امولسیون بدون عصاره تجویز گردید)، گروه ۲: گروه نوروپاتی (در این گروه عصب سیاتیک سمت چپ دچار نوروپاتی شد)، گروه ۳: گروه نوروپاتی + عصاره سنبل‌الطیب، گروه ۴: گروه نوروپاتی + امولسیون عصاره سنبل‌الطیب، که امولسیون خوراکی سنبل‌الطیب و عصاره آن به صورت جداگانه به گروه مربوطه گاواژ شدند.

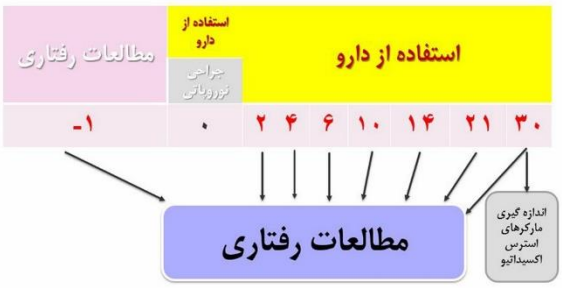
روش جراحی القای درد نوروپاتیک ناشی از ضایعه انسدادی مزمن عصب سیاتیک

جهت ایجاد مدل CCI از روش Xie و Bennett استفاده شد. به این صورت که بعد از بیهوش نمودن حیوان با کتامین و زایلازین موهای بالا و پشت ران حیوان کاملاً تراشیده و با استفاده از تیغ بیستوری شکافی به طول ۲ سانتی‌متر بر روی ران پای چپ ایجاد گردید. پس از بریدن عضلات، سعی شد تا قسمت مشترک سه شاخه عصب سیاتیک رؤیت گردد، سپس با استفاده از یک میله کوچک شیشه‌ای بافت‌های اطراف عصب، جدا و به وسیله نخ بخیه کات‌کوت ۴/۰ چهار گره شل به فواصل یک میلی‌متر قبل از سه

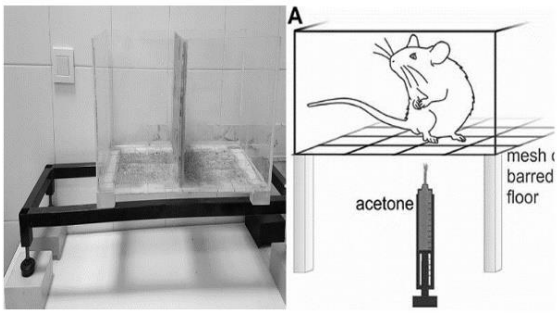
شاخه شدن عصب زده شد. گره‌ها به شکلی زده می‌شد که اختلالی در جریان خون عصب به وجود نیاورد (شاخص ما جهت میزان کشیدگی گره توئیچی است که با زدن گره در پای حیوان مشاهده می‌گردد). آنگاه با استفاده از نخ بخیه ۴/۰ سیلک، عضله و پوست به صورت جداگانه دوخته شدند. پس از عمل جراحی، حیوان بی-هوش، ابتدا به قفس و بعد از به هوش آمدن به اتاق مخصوص نگهداری حیوانات منتقل گردید. سپس طبق برنامه و پروتکل مربوطه بررسی اعمال رفتاری انجام گرفت.

روش بررسی اعمال رفتاری

تست‌های بررسی رفتار حسی حیوانات، در روزهای صفر (قبل از جراحی)، و (بعداز جراحی) ۲، ۴، ۶، ۱۰، ۱۴، ۲۱، ۳۰ به فاصله ۶۰ دقیقه بعد از دریافت دارو به ترتیب مطابق شکل ۱ انجام گرفتند.



شکل-۱. دیاگرام روش انجام مطالعات در گروه‌های آزمایشی



شکل-۲. آزمون بررسی آلودینیا در حیوانات

آلودینیای حرارتی (تست‌استن)

از این تست جهت مشخص کردن حساسیت حیوان به آلودینیای حرارتی استفاده گردید. در این روش حیوان بر روی یک شبکه سیمی قرار گرفت سپس به وسیله یک سرنگ انسولین که به جای سوزن آن، لوله باریک پلی‌پروپیلن قرار داشت، یک قطره استن به کف پای چپ حیوان پاشیده شد. این آزمایش ۵ بار و هر بار به فاصله ۳ دقیقه انجام گرفت. در صورتی که حیوان با پاشیده شدن استن پای خود را بلند می‌کرد، پاسخ مثبت و در غیر این صورت پاسخ منفی در نظر گرفته می‌شد (شکل ۲). در پایان درصد پاسخ (R) به وسیله فرمول زیر محاسبه گردید.

$$R = (\text{دفعات تحریک/ تعداد پاسخ مثبت}) \times ۱۰۰$$

تست رفتاری ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع (EPM)

این ابزار از جنس چوب و دارای چهار بازو به شکل علامت مثبت (+) است. ابعاد راهرو باز و بسته ۱۰×۵۰ بوده و دو طرف، و انتهای راهرو بسته دیواره‌ای به بلندی ۴۰ سانتی‌متر داشته و برای جلوگیری از افتادن موش‌ها در دو طرف و انتهای بازوی باز، لبه‌های به ارتفاع یک سانتی‌متر از جنس شیشه نصب گردید. چهارراهرو به یک محدوده مرکزی به ابعاد ۱۰×۱۰ سانتی‌متر منتهی می‌شوند. ماز توسط پایه‌هایی در ارتفاع ۵۰ سانتی‌متر از سطح زمین قرار می‌گیرد. موش‌ها درون محدوده مرکزی ماز قرار می‌گرفتند، به-طوری که رو به یک بازوی باز قرار می‌گرفتند. نور مناسب توسط یک لامپ ۱۰۰ واتی که در ارتفاع ۱۲۰ سانتی‌متری از مرکز ماز قرار داشت، تامین می‌شد. در مدت ۵ دقیقه‌ای که حیوان آزادانه در قسمت‌های مختلف ماز حرکت می‌کرد، پارامترهای زیر به روش مشاهده و فیلم برداری با دوربین مناسب اندازه‌گیری می‌شد:

۱) تعداد دفعاتی که حیوان وارد راهرو باز می‌شود؛ ۲) تعداد دفعاتی که حیوان وارد راهرو بسته می‌شود؛ ۳) مدت زمانی که حیوان در راهرو باز باقی می‌ماند؛ ۴) مدت زمانی که حیوان در راهرو بسته باقی می‌ماند.

منظور از ورود به راهرو باز یا بسته هنگامی است که هر چهار پای حیوان در راهرو مورد نظر قرار می‌گرفت. زمان گذرانده شده در هر راهرو نیز بر همین اساس محاسبه شده است. برای حیوانات زمان محاسبه شده ورود به بازوی باز و زمان محاسبه شده گذرانده در راهرو باز به دست می‌آید (شکل ۳).

افزایش معنی‌دار این دو پارامتر، نشان‌دهنده کاهش اضطراب است. حیوانات مضطرب ترجیح می‌دهند بیشتر در بازوهای بسته بمانند و زمان کمتری را به جستجو در بازوهای باز بپردازند.

اندازه‌گیری مارکراسترس اکسیداتیو

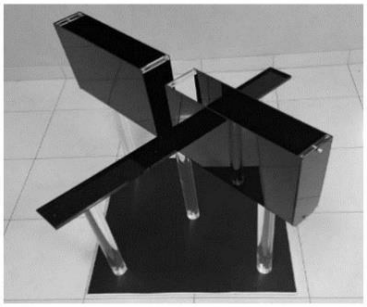
در مطالعه حاضر، میزان پراکسیدیون لیپید مالون‌دی‌آلدئید در بافت مغز با استفاده از کیت‌های مخصوص بیوشیمیایی (شرکت نوین نوند سلامت، ارومیه، ایران) و طبق پروتکل ارائه شده توسط آن شرکت به روش فلومتریک اندازه‌گیری گردید.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در آزمون‌های مطالعه حاضر، برای بررسی وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها، از انجام مقایسه آماری داده‌ها بر اساس آزمون تعقیبی توکی و انوا استفاده گردید و داده‌ها به صورت میانگین، به عنوان سطح معنی‌دار بودن در $P<۰/۰۵$، معیار میانگین برای هر گروه در تمامی مراحل نظر گرفته شد، و آنالیز نتایج به کمک نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۴ انجام گرفت. برای نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف–اسمیرنوف استفاده شد. سطح معنی‌داری بیشتر از ۰/۰۵ بود که می‌توان داده‌ها را با احتمال بالایی نرمال فرض کرد.

ملاحظات اخلاقی

این پژوهش مصوب کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) با کد IR.BMSU.AEC.1400.012



تعداد ورود به راهرو باز
= زمان محاسبه شده ورود به راهرو باز
تعداد ورود به راهرو باز + تعداد ورود به راهرو بسته

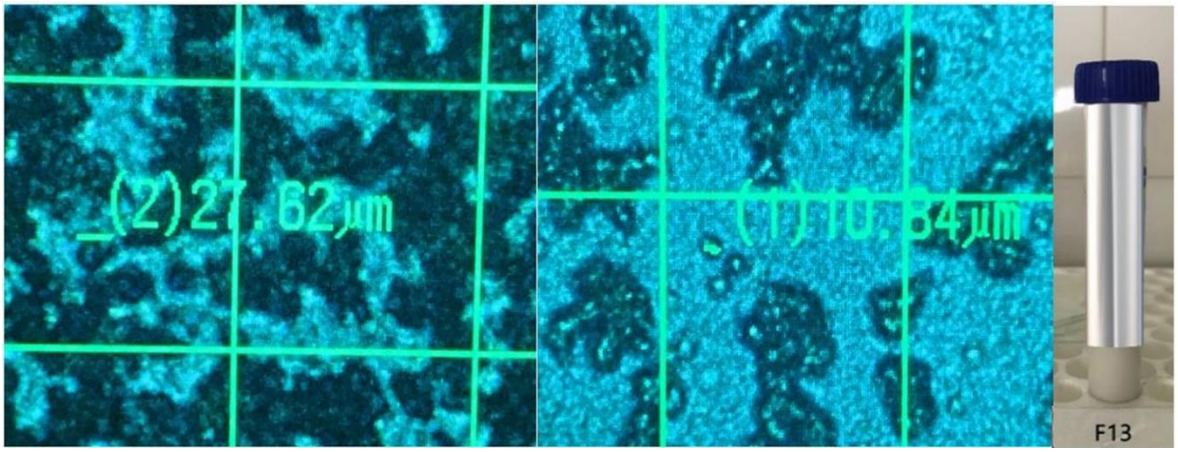
= زمان محاسبه شده گذرانده در راهرو باز
مدت زمان گذرانده شده در راهرو باز
مدت زمان گذرانده شده در راهرو باز + مدت زمان گذرانده شده در راهرو بسته

شکل-۳. آزمون ماز بعلاوه مرتفع

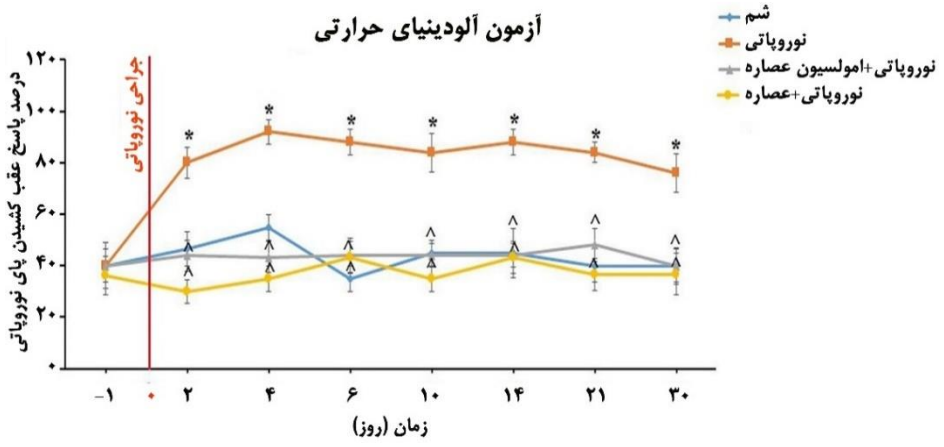
است. تمامی اصول ایمنی و بهداشتی و اخلاقی در کار با وسایل و مواد آزمایشگاهی و نیز کار با حیوانات آزمایشگاهی (از قبیل دستکش، روپوش مناسب و جداگانه و شست و شوی مرتب دست‌ها و) و همچنین تهیه و تجویز دارو .... در طول انجام این پژوهش رعایت شد.

نتایج

امولسیون تهیه شده: در این مطالعه، امولسیون تهیه شده از عصاره هیدروالکلی سنبل‌الطیب، یک امولسیون روغن در آب بود که رنگ و کدورت آن به صورت شیری رنگ و کدر و دارای pH حدود ۶ بود. همچنین سایز قطرک‌های امولسیون بین ۳۰-۱۰ میکرون قرار داشت و پراکندگی مناسبی داشتند که بیانگر ایجاد یک ماکروامولسیون بود (شکل ۴). همچنین، امولسیون فرموله شده بر حسب روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۶ ماه در دمای اتاق پایدار بود و نوع امولسیون، شکل، رنگ و سایز قطرک‌ها تغییر به خصوصی نداشتند.



شکل-۴. نمونه تصویر امولسیون و تصویر میکروسکوپی سایز قطرک‌های فرمولاسیون F۱۳ با بزرگنمایی ۱۰x



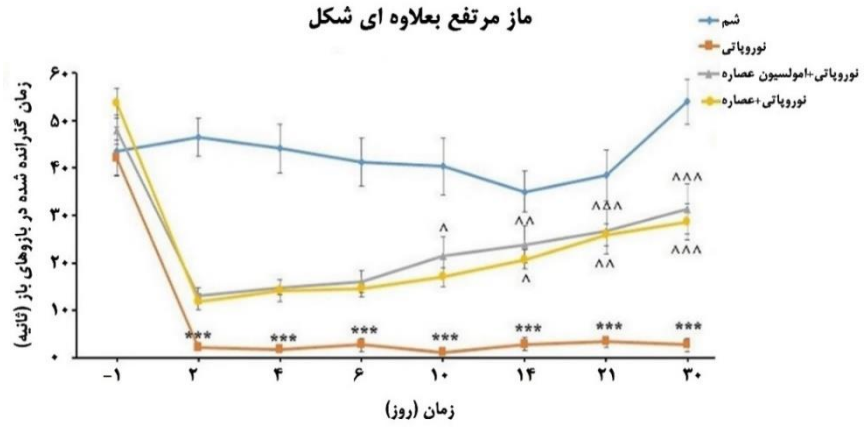
نمودار-۱. اثرات گاواژ و امولسیون سنبل‌الطیب بر آلودینیای سرمایی

اثرات گاواژ و امولسیون سنبل‌الطیب بر آلودینیای سرمایی: تجویز جداگانه عصاره و امولسیون سنبل‌الطیب سبب کاهش آلودینیای سرد در تمام روزهای پس از جراحی نوروپاتی در مقایسه با گروه نوروپاتی شدند. بین گروه‌های امولسیون عصاره سنبل‌الطیب در هیچ یک از روزهای مورد آزمایش تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (نمودار ۱).

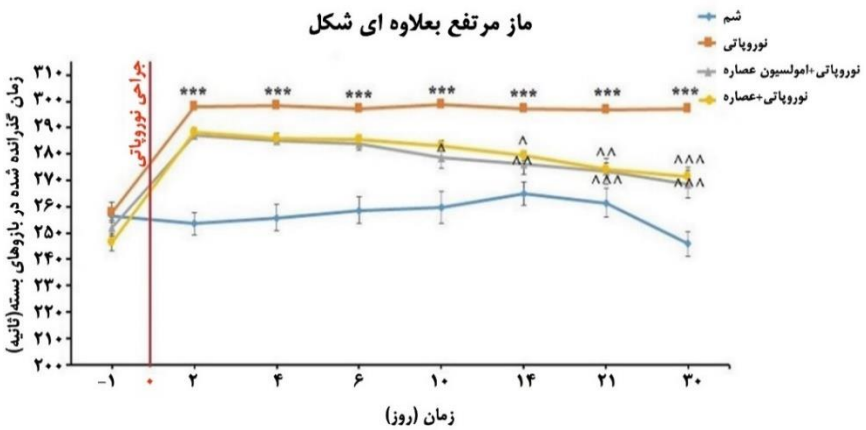
تغییرات در پاسخ عقب کشیدن پای نوروپاتی به قطره استون (آلودینیا سرمایی) در روز ۱- (یک روز قبل از جراحی نوروپاتی) و روزهای ۲، ۴، ۶، ۱۰، ۱۴، ۲۱ و ۳۰ پس از جراحی نوروپاتی پس از گاواژ عصاره و امولسیون سنبل‌الطیب ارزیابی شد. همه داروها روزانه از روز اول تا ۳۰ پس از القای نوروپاتی به موش‌ها به صورت گاواژ داخل معدی داده شد. تمام داده‌ها نشان‌دهنده میانگین ± خطای استاندارد می‌باشد. تفاوت در پارامترهای اندازه‌گیری شده در بین گروه‌های مختلف با استفاده از آنالیز واریانس دو طرفه و یک طرفه و به دنبال آن آزمون تعقیبی توکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نمادهای * و ^ به ترتیب نشان‌دهنده تفاوت‌های معنی‌دار با گروه‌های شم و نوروپاتی می‌باشند.

اثرات گاواژ و امولسیون سنبل‌الطیب بر رفتارهای شبه اضطرابی: علاوه بر این، جراحی CCI سبب ایجاد اضطراب در موش‌ها شد. که تجویز عصاره و امولسیون سنبل‌الطیب توانست به طور معنی‌داری سبب کاهش زمان سپری شده در بازوهای باز (یا به طور مشابه افزایش زمان سپری شده در بازوهای بسته) تست رفتاری ماز مرتفع بعلاوه‌ای شکل، در روزهای ۱۴، ۲۱ و ۳۰ پس از جراحی نوروپاتی شد، با این تفاوت که با تجویز امولسیون عصاره این روند افزایشی در بازوهای باز (یا به طور مشابه کاهشی در بازوهای بسته) زودتر و از روز ۱۰ پس از جراحی نوروپاتی شروع شد ($P<۰/۰۰۱$) (نمودار ۲ و ۳).

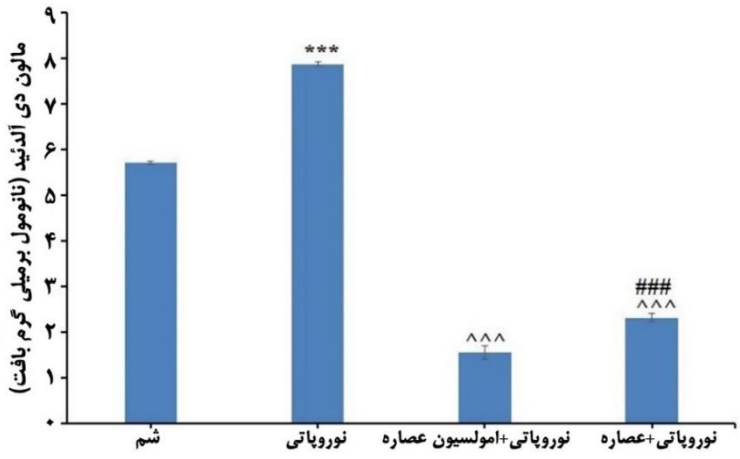
تغییرات در پاسخ عقب کشیدن پای نوروپاتی به قطره استون (آلودینیا سرمایی) در روز ۱- (یک روز قبل از جراحی نوروپاتی) و روزهای ۲، ۴، ۶، ۱۰، ۱۴، ۲۱ و ۳۰ پس از جراحی نوروپاتی پس از گاواژ عصاره و امولسیون سنبل‌الطیب ارزیابی شد. همه داروها روزانه از روز اول تا ۳۰ پس از القای نوروپاتی به موش‌ها به صورت گاواژ داخل معدی داده شد. تمام داده‌ها نشان دهنده‌میانگین ± خطای استاندارد می‌باشد. تفاوت در پارامترهای اندازه‌گیری شده در بین گروه‌های مختلف با استفاده از آنالیز واریانس دو طرفه و یک طرفه و به دنبال آن آزمون تعقیبی توکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نمادهای * و ^ به ترتیب نشان دهنده تفاوت‌های معنی‌دار با گروه‌های شم و نوروپاتی می‌باشند.



نمودار -۲. اثرات گاواژ و امولسیون سنبل‌الطیب بر رفتارهای شبه اضطرابی (بازوهای باز)



نمودار-۳. اثرات گاواژ و امولسیون سنبل‌الطیب بر رفتارهای شبه اضطرابی (بازوهای بسته)



نمودار-۴. اثرات گاواژ و امولسیون سنبل‌الطیب بر پراکسیداسیون لیپید مالون‌دی‌آلدئید

تغییرات در زمان سپری شده در بازوهای بسته در روز ۱- (یک روز قبل از جراحی نوروپاتی) و روزهای ۲، ۴ ، ۶، ۱۰، ۱۴، ۲۱ و ۳۰ بعد از جراحی نوروپاتی پس از گاواژ داروها، بااستفاده از دستگاه ماز مرتفع بعلاوه ای شکل ارزیابی شد. همه داروها روزانه از روز اول تا ۳۰ پس از القای نوروپاتی به موش‌ها گاواژ شد. تمام داده‌ها نشان‌دهنده میانگین ± خطای استاندارد می‌باشند. تفاوت در پارامترهای اندازه‌گیری شده در بین گروه‌های مختلف با استفاده از آنالیز واریانس دو طرفه و یک طرفه و به دنبال آن آزمون تعقیبی توکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نمادهای * و ^ به ترتیب نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار با گروه شم و گروه نوروپاتی می‌باشند.

اثرات گاواژ و امولسیون سنبل‌الطیب بر پراکسیداسیون لیپید مالون‌دی‌آلدئید (MDA): همچنین تجویز عصاره و امولسیون به طور معنی‌داری میزان MDA مغز را در موش‌های نوروپاتیک در مقایسه با گروه CCI کاهش دادند با این تفاوت که امولسیون عصاره باعث کاهش بیشتر میزان مالون‌دی‌آلدئید ، نسبت به عصاره گردید ($P<۰/۰۰۱$) (نمودار ۴).

تغییرات میزان مالون‌دی‌آلدئید حیوانات در روز ۳۰ پس از جراحی نوروپاتی، ۴۵ تا ۶۰ دقیقه پس از گاواژ عصاره و امولسیون ارزیابی شد. عصاره و امولسیون روزانه از روز ۱ تا روز ۳۰، پس از القای نوروپاتی به حیوانات به صورت گاواژ داده شدند. تمام داده‌ها نشان‌دهنده میانگین ± خطای‌استاندارد می‌باشد. تفاوت در پارامترهای اندازه‌گیری شده در بین گروه‌های مختلف بااستفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و به دنبال آن آزمون تعقیبی توکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نمادهای * و ^ و # به ترتیب نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار با گروه شم و گروه نوروپاتی و گروه امولسیون عصاره سنبل‌الطیب می‌باشند.

بحث

جراحی CCI، یکی از مدل‌های حیوانی ایجاد درد نوروپاتیک است که از آن برای بررسی اثرات ضد دردی و ضد اضطرابی بسیاری از ترکیبات گیاهی و شیمیایی استفاده می‌شود (۲۰) و در این پژوهش، مدل CCI باعث ایجاد آلودینیای سرد، هایپرآلژزی و رفتارهای شبه اضطرابی در حیوانات گردید، که با گزارش‌های منتشر شده قبلی قابل انطباق است. همچنین شواهد بالینی و پیش بالینی بسیاری به وضوح نشان می‌دهد که استرس اکسیداتیو نقش مهمی در ایجاد درد نوروپاتیک و تداوم آن پس از جراحی CCI دارد. بنابراین، کاهش استرس اکسیداتیو از طریق استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی طبیعی و مصنوعی، پردردی و آلودانیا را در مدل‌های حیوانی مختلف درد نوروپاتیک بهبود می‌بخشد (۲۱،۲۲). در مطالعه حاضر، آنالیز نتایج نشان داد که گاواژ عصاره و امولسیون سنبل‌الطیب به مدت ۳۰ روز به طور معنی‌داری سبب کاهش آلودینیای سرد در تست استن شد. همچنین، بین گروه‌های عصاره و امولسیون در هیچ یک از روزهای مورد آزمایش تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. در واقع، این نتیجه نشان داد که گاواژ عصاره و یا امولسیون سنبل‌الطیب می‌تواند اثرات ضددردی را در موش‌های نوروپاتیک ایجاد کند. همچنین، سنجش اثرات گاواژ امولسیون و عصاره بر پراکسیداسیون لیپید مالون‌دی‌آلدئید در بافت مغز، نشان داد که تجویز عصاره و امولسیون سنبل‌الطیب، هر دو سبب کاهش معنی‌دار میزان مالون‌دی‌آلدئید نسبت به گروه CCI شدند، با این تفاوت که تجویز امولسیون توانست سبب کاهش معنی‌دار بیشتری در میزان مالون‌دی‌آلدئید، نسبت به گروه سنبل‌الطیب گردد و به عبارت دیگر، میزان مالون‌دی‌آلدئید به عنوان فاکتور استرس اکسیداتیو و دخیل در درد، با تجویز امولسیون عصاره سنبل‌الطیب به مقدار بیشتری کاهش یافت. همانطور که در مطالعات پیشین ثابت شده است که القای CCI سبب ایجاد التهاب در سیستم ایمنی- عصبی موش صحرایی می‌شود، از طرفی التهاب و درد توسط آنزیم‌های سیکلواکسیژناز (COX) به‌ویژه COX2 سبب سنتز پروستاگلاندین‌ها (PGs) (همانند PGE2 و PGF2α که با غلظت بالایی در محل التهاب حضور دارند) می‌شوند (۲۳). همچنین در پژوهش‌ها نشان داده شده است که استفاده از آنتی اکسیدان‌ها قادر به کاهش

صدمات ناشی از استرس اکسیداتیو و ایجاد تعادل ردوکس در بیماران می‌باشد. بنابراین بررسی تاثیر آنتی‌اکسیدان‌ها در تسکین دردهای مزمن نیز حائز اهمیت است (۲). همانطور که بیان شد گیاه سنبل‌الطیب نیز، از ترکیبات گیاهی است که امروزه مطالعات زیادی در زمینه اثرات ضد دردی و ضد اضطرابی آن در بدن در حال انجام است. چنانکه جنابی و همکاران در سال ۱۳۹۱، اثر ضد دردی ریشه گیاه سنبل‌الطیب در تسکین دیسمنوره اولیه را نشان داده‌اند (۲۴). همچنین Sudati و همکاران در سال ۲۰۰۹ اثرات آنتی‌اکسیدانی سنبل‌الطیب را نشان دادند که با نتایج این پژوهش هم جهت بود (۴).

در مطالعه حاضر، آنالیز نتایج نشان داد که گاواژ عصاره سنبل الطیب به مدت ۳۰ روز توانست در تست ماز مرتفع بعلاوه ای شکل به طور معنی‌داری سبب کاهش زمان سپری شده در بازوهای بسته و افزایش زمان سپری شده در بازوهای باز در روزهای ۱۴، ۲۱ و ۳۰ پس از جراحی نوروپاتی شود. به طور مشابه، گاواژ امولسیون سنبل‌الطیب نیز توانست به طور معنی‌داری سبب کاهش زمان سپری شده در بازوهای بسته و افزایش زمان سپری شده در بازوهای باز شود که این روند کاهشی زودتر و از روز ۱۰ پس از جراحی نوروپاتی شروع شد. در واقع، این نتیجه نشان می‌دهد که گاواژ امولسیون سنبل‌الطیب می‌تواند اثرات ضد اضطرابی سریع‌تری در موش‌های نوروپاتیک داشته باشد، که با توجه به فرمولاسیون تهیه شده و خصوصیات فیزیکو شیمیایی آن حائز اهمیت است و بررسی بیشتر در مطالعات آینده را می‌طلبد. همچنین سنجش اثرات گاواژ عصاره و امولسیون بر پراکسیداسیون لیپید مالون دی آلدهید در بافت مغز نشان داد که تجویز عصاره و امولسیون سنبل‌الطیب، هر دو سبب کاهش معنی‌دار میزان مالون‌دی‌آلدئید نسبت به گروه نوروپاتی شدند. با این تفاوت که تجویز امولسیون توانست سبب کاهش معنی‌دار بیشتری در میزان مالون‌دی‌آلدئید، نسبت به گروه سنبل‌الطیب گردد و به عبارت دیگر، میزان مالون‌دی‌آلدئید، به عنوان فاکتور استرس اکسیداتیو و ایجاد اضطراب با تجویز امولسیون عصاره سنبل‌الطیب به مقدار بیشتری کاهش یافت که با مطالعه Murphy و همکاران که نشان دادند سنبل‌الطیب در آزمون ماز مرتفع بعلاوه ای شکل اثرات ضداضطرابی از خود بروز می‌دهد هم راستا بود (۹). همچنین مطالعه Wang و همکاران در سال ۲۰۲۲، با مضمون مروری بر پیشرفت اخیر در بهبود فراهمی زیستی امولسیون‌های حاوی مواد مغذی پس از مصرف خوراکی، با اثرات مثبت امولسیون تهیه شده، هم‌سو بود (۶).

نتیجه‌گیری

بعد از القای درد نوروپاتیک مزمن به موش صحرایی و تجویز عصاره و امولسیون هیدروالکلی سنبل‌الطیب، نتایج مثبت و موثری بر کنترل درد، بهبود اضطراب وکنترل استرس اکسیداتیو مشاهده شد. همچنین بر طبق نتایج مشخص شد که شکل دارویی امولسیون عصاره به دلیل افزایش سطح تماس دارو با سلول‌های بدن و در نتیجه جذب بیشتر و فراهمی‌زیستی بالاتر، در مقایسه با عصاره می‌تواند در رسیدن به هدف درمانی، سریع‌تر عمل نماید و همین امر می‌تواند در کاهش دز مصرفی و به دنبال آن کاهش عوارض جانبی احتمالی و افزایش پذیرش بیمار تاثیر گذار باشد و می‌تواند بیانگر بهبود روند درمانی از طریق ایجاد امولسیون عصاره گیاهی سنبل‌الطیب باشد و به اهمیت بیشتر در بررسی فرمولاسیون امولسیون تهیه شده و شرایط بهبود کیفیت و پایداری آن در مطالعات آینده بیافزاید.

نکات بالینی کاربردی برای جوامع نظامی

- بهبود و کنترل دردهای عصبی ناشی از صدمات جنگی در نیروهای نظامی
- بهبود و کنترل اضطراب ناشی از صدمات جنگی در نیروهای نظامی

تشکر و قدردانی: مقاله حاضر برگرفته از طرح تحقیقاتی مصوب در کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) با کد IR. BMSU.AEC.1400.012 است. نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از کلیه کسانی که در انجام این تحقیق یاری نمودند، اعلام می‌نمایند.

تضاد منافع: نویسندگان تصریح می‌کنند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

منابع

1. Hestehave S, Abelson KS, Pedersen TB, Finn DP, Andersson DR, Munro G. The influence of rat strain on the development of neuropathic pain and comorbid anxio-depressive behaviour after nerve injury. Scientific Reports. 2020;10(1):20981. doi:10.1038/s41598-020-77640-8
2. Forouzanfar F, Hosseinzadeh H. Medicinal herbs in the treatment of neuropathic pain: a review. Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 2018;21 (4):347-58. doi:10.22038/IJBMS.2018.24026.6021
3. Quintans JS, Antoniolli AR, Almeida JR, Santana-Filho VJ, Quintans-Júnior LJ. Natural products evaluated in neuropathic pain models-a systematic review. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. 2014;114(6):442-50. doi:10.1111/bcpt.12178
4. Sudati JH, Fachinetto R, Pereira RP, Boligon AA, Athayde ML, Soares FA, et al. *In vitro* antioxidant activity of Valeriana officinalis against different neurotoxic agents. Neurochemical Research. 2009; 34:1372-9. doi.10.1007/s11064-009-9917-8
5. Dugaheh MA, Meisami F, Torabian Z, Sharififar F. Antioxidant effect and study of bioactive components of Valeriana sisymbriifolia and Nardostachys jatamansii in comparison to Valeriana

officinalis. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences. 2013;26(1):53-9.
6. Wang X, Shi G, Fan S, Ma J, Yan Y, Wang M, et al. Targeted delivery of food functional ingredients in precise nutrition: design strategy and application of nutritional intervention. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2023:1-24. doi:10.1080/10408398.2023.2193275
7. McClements DJ, SalivaTrujillo L, Zhang R, Zhang Z, Zou L, Yao M, et al. Biopolymers and Colloids Laboratory, Department of Food Science, University of Massachusetts Amherst, Amherst, MA 01003, USA.
8. Ilari S, Giancotti LA, Lauro F, Gliozzi M, Malafoglia V, Palma E, et al. Natural antioxidant control of neuropathic pain—exploring the role of mitochondrial sirt3 pathway. Antioxidants. 2020;9(11):1103. doi:10.3390/antiox9111103
9. Murphy K, Kubin ZJ, Shepherd JN, Ettinger R. Valeriana officinalis root extracts have potent anxiolytic effects in laboratory rats. Phytomedicine. 2010;17(8-9):674-8. doi:10.1016/j.phymed.2009.10.020
10. Lee H, Won H, Im J, Kim YO, Lee S, Cho IH, et al. Effect of Valeriana fauriei extract on the offspring of adult rats exposed to prenatal stress. International Journal of Molecular Medicine. 2016;38(1):251-8. doi:10.3892/ijmm.2016.2589
11. Amanzadeh Y. Herbal Pharmacopoeia. 1st ed, Tehran. Food and Drug Department of the Ministry of Health and Medical Education; 2003, pp. 456. [In Persian]
12. Occhiuto F, Pino A, Palumbo DR, Samperi S, De Pasquale R, Sturlese E, et al. Relaxing effects of *Valeriana officinalis* extracts on isolated human non-pregnant uterine muscle. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2009;61(2):251-6. doi:10.1211/jpp.61.02.0016
13. Rezaie A, Pashazadeh M, Ahmadizadeh C, Jafari BE, Jalilzadeh HM. Study of sedative and anxiolytic effect of herbal extract of Nardostachys jatamansi in comparison with diazepam in Rats. Journal of Medicinal Plants. 2010;9(36):169-74. [In Persian]
14. Gruenwald J, Brendler T, Jaenicke C. PDR for herbal Medicine. Economics Company, USA. 2000, pp. 783.
15. Fernández S, Wasowski C, Paladini AC, Marder M. Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from Valeriana officinalis. Pharmacology Biochemistry and Behavior. 2004;77(2):399-404. doi:10.1016/j.pbb.2003.12.003
16. Houghton PJ. The scientific basis for the reputed activity of Valerian. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 1999;51(5):505-12. doi:10.1211/0022357991772772
17. Khajehpour L, Moosapour SF, Seyyednejad SM. The involvement of adrenergic system in the anxiolytic effect of hydro-alcoholic extract of *Valeriana officinalis* in male mice. KAUMS Journal (FEYZ). 2014;18(4):361-8. [In Persian]
18. Carrettiero DC, da Silva SM, Fior-Chadi DR. Adenosine modulates alpha2-adrenergic receptors through a phospholipase C pathway in brainstem cell culture of rats. Autonomic Neuroscience. 2009;151(2):174-7. doi:10.1016/j.autneu.2009.05.251
19. Moazeni M, Davari A, Shabanzadeh S, Akhtari J, Saeedi M, Mortyeza-Semnani K, et al. *In vitro* antifungal activity of *Thymus vulgaris* essential oil nanoemulsion. Journal of Herbal Medicine. 2021;28:100452. doi:10.1016/j.hermed.2021.100452
20. Hameroff SR, Weiss JL, Lerman JC, Cork RC, Watts KS, Crago BR, et al. Doxepin's effects on chronic pain and depression: a controlled study. The Journal of Clinical Psychiatry. 1984;45(3 Pt 2):47-53.
21. Finnerup NB, Attal N, Haroutounian S, McNicol E, Baron R, Dworkin RH, et al. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. The Lancet Neurology. 2015;14(2):162-73. doi:10.1016/S1474-4422(14)70251-0
22. Stahl SM, Porreca F, Taylor CP, Cheung R, Thorpe AJ, Clair A. The diverse therapeutic actions of pregabalin: is a single mechanism responsible for several pharmacological activities?. Trends in Pharmacological Sciences. 2013;34(6):332-9. doi:10.1016/j.tips.2013.04.001
23. Deraedt R, Jouquey S, Delevallée F, Flahaut M. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. European Journal of Pharmacology. 1980;61(1):17-24. doi:10.1016/0014-2999(80)90377-5
24. Jenabi E, Asle Toghiri M, Hejrati P. The comparison of the effects of antiplain of valeriana officinalis risom and mefenamic acid in relief of primary dismenorrhea. The Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility. 2012;15(2):42-7. [In Persian] doi:10.22038/ijogi.2012.5743