

# Pain Relief and Kaempferol: Activation of Transient Receptors Potential Vanilloid Type 1 in Male Rats

Mohammad Zarei (PhD)<sup>1,\*</sup>, Zohre Izadi Dastenaei (MSc)<sup>2</sup>, Sajjad Jabbari (MSc)<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Associate Professor of Physiology, Neurophysiology Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

<sup>2</sup> MSc of Physiology, Neurophysiology Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

<sup>3</sup> PhD Student of Animal Physiology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran

\* Corresponding Author: Mohammad Zarei, Neurophysiology Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran. Email: zarei@umsha.ac.ir

## Abstract

Received: 07/01/2020

Accepted: 06/02/2020

### How to Cite this Article:

Zarei M, Izadi Dastenaei Z, Jabbari S. Pain Relief and Kaempferol: Activation of Transient Receptors Potential Vanilloid Type 1 in Male Rats. *Pajouhan Scientific Journal*. 2020; 18(2): 81-89. DOI: 10.52547/psj.18.2.81

**Background and Objective:** Pain an unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage, or described in terms of such damage. Kaempferol is one of the most important herbal active constituent with antinociceptive effects. The aim of this study was to evaluate the effects of intracerebroventricular injection of kaempferol and its interaction with the transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1) on pain in male rats.

**Materials and Methods:** In this experimental study, sixty male rats (200-250 g) were divided to the following groups: control (saline), Dimethyl sulfoxide (DMSO), morphine, kaempferol at dosages of 0.5, 1, and 1.5 mg/rat, capsaicin, capsazepine, capsaicin plus kaempferol (1.5 mg/rat), capsazepine plus kaempferol (1.5 mg/rat). After cannula implantation in cerebroventricular area, the rats received target components and then evaluated by pain assessment tests (abdominal writhing, tail-flick, and formalin tests). Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post-test and P<0.05 was as a significant difference.

**Results:** The results showed that administration of kaempferol had significant analgesic effects in comparison to the control/DMSO groups on the tail-flick, abdominal writhing, and formalin tests (P<0.05). Co-administration of capsaicin and kaempferol (1.5 mg/ rat) had significant analgesic effects compared to the control/DMSO groups although, not a synergist. Moreover, co-administration of capsazepine and kaempferol (1.5 mg/ rat) mostly decreased antinociceptive effects of kaempferol.

**Conclusion:** The kaempferol probably has both acute and inflammatory antinociceptive effects and exert this activity at least in part by activating TRPV1 receptors.

**Keywords:** Kaempferol; Vanilloid Type 1 Receptors; Pain; Central Nervous System

## تسکین درد و کامپفرون: فعالیت گیرنده‌های وانیلوئیدی نوع ۱ در موش‌های صحرایی نر

محمد زارعی<sup>۱\*</sup>, زهره ایزدی دستنایی<sup>۲</sup>, سجاد جباری<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانشیار فیزیولوژی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

<sup>۲</sup> کارشناسی ارشد فیزیولوژی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

<sup>۳</sup> دانشجوی دکتری تخصصی فیزیولوژی جانوری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

\* نویسنده مسئول: محمد زارعی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران. ایمیل: zarei@umsha.ac.ir

### چکیده

**سابقه و هدف:** درد حسی ناخوشایند و تجربه‌ای احساسی همراه با آسیب بافتی واقعی یا بالقوه می‌باشد. کامپفرون یکی از مواد مؤثره‌ی گیاهی است که دارای خواص ضد دردی می‌باشد. هدف از این مطالعه تعیین اثر تزریق داخل بطن مغزی کامپفرون و ارتباط آن با گیرنده‌ی وانیلوئیدی نوع ۱ بر روی درد در موش‌های صحرایی نر بود.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۱۰/۱۷

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۱۱/۱۷

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی همدان محفوظ است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه‌ی تجربی، تعداد ۶۰ سررت نر نژاد ویستر (۲۰۰-۲۵۰ گرم) به گروه‌های سالین یا کنترل، دی متیل سولفوکساید (DMSO) یا حلال، مورفین، کپساکسین، کپسازپین، کامپفرون با دوزهای ۱/۵ و ۱۰/۵ میلی‌گرم بر رت، کاپساکسین+ کامپفرون با دوز ۱/۵ میلی‌گرم بر رت و کاپساکسین+ کامپفرون با دوز ۱/۵ میلی‌گرم بر رت تقسیم شدند. رت‌ها پس از کانول‌گذاری در داخل بطن مغزی، ترکیبات مورد نظر را دریافت کردند و سپس تست‌های ارزیابی کننده درد (تست پرش دم، تست انقباضات شکمی و تست فرمالین) مورد آزمایش قرار گرفتند. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه و پس آزمون توکی با هم مقایسه شدند.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد در تست‌های پرش دم، انقباضات شکمی و فرمالین کامپفرون اثرات ضد دردی معناداری در مقایسه با گروه‌های سالین و حلال داشت ( $P < 0.01$ ). تزریق تؤام کپساکسین و کامپفرون با دوز ۱/۵ میلی‌گرم بر رت هم اثر ضد دردی معناداری در مقایسه با گروه کامپفرون ۱/۵ میلی‌گرم بر رت نشان داد؛ اگرچه هم افزا نبود ( $P > 0.05$ ). علاوه بر این، بکارگیری همزمان کپساکسین و کامپفرون با دوز ۱/۵ میلی‌گرم بر رت اثرات ضد دردی کامپفرون را کاهش داد ( $P < 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** کامپفرون دارای اثرات ضد دردی حاد و التهابی بوده و حداقل بخشی از این اثرات را از طریق بر هم کنش با گیرنده‌های وانیلوئیدی نوع یک اعمال می‌کند.

**واژگان کلیدی:** کامپفرون؛ گیرنده‌ی وانیلوئیدی نوع یک؛ درد؛ سیستم عصبی مرکزی

### مقدمه

همراه هستند که در مجموع باعث شده است انسان به دنبال داروهای جدیدتری باند تا علاوه بر داشتن عوارض جانبی کمتر، ارزان و در دسترس هم باشند [۲، ۳]. مطالعات قبلی نشان داده است که اغلب ترکیبات طبیعی و بخصوص گیاهان دارویی می‌توانند منبع بسیار مهمی به منظور یافتن ترکیبات جدیدتر داروها باشند. ایجاد حالت تعادل بیولوژیکی مواد مؤثره موجود در گیاهان دارویی و جلوگیری از انباسته شدن آن‌ها در بدن، عوارض جانبی کمتر و یا نداشتن عوارض جانبی قابل ملاحظه آن‌ها نسبت به داروهای شیمیایی ضد دردی سبب اقبال گیاهان دارویی شده است [۴، ۵]. از جمله مواد مؤثره

درد یکی از مشکلات اساسی در جوامع امروزی است و وجود آن احساس ناخوشایندی دارد که انسان را وادار می‌کند برای مقابله با آن از روش‌های مختلف درمانی استفاده نماید [۱]. در گزارش انجمن درد آمریکا آمده است که حدود پنجاه میلیون نفر در آمریکا در سینین مختلف از درد رنج می‌برند که کنترل آن نیازمند بیش از ۳۰ میلیارد دلار هزینه می‌باشد. امروزه برای کنترل درد بیشتر از داروهای ضد التهاب غیراستروئیدی و یا داروهای اوپیوئیدی استفاده می‌شود که این داروها دارای عوارض جانبی زیادی بوده و با بروز اختلالات در دستگاه گوارش، آسیب‌های کلیوی و یا با وابستگی

و کانول گذاری داخل بطن مغزی فقط مورفین با دوز مؤثر ۱۰ میکروگرم به ازای هر رت دریافت کردند. گروه کامپفروول ۰/۵، رتهایی که بعد از جراحی و کانول گذاری داخل بطن مغزی فقط کامپفروول با دوز ۰/۵ میلی‌گرم به ازای هر رت دریافت کردند. گروه کامپفروول ۱، رتهایی که بعد از جراحی و کانول گذاری داخل بطن مغزی کامپفروول با دوز ۱ میلی‌گرم به ازای هر رت به ازای هر رت دریافت کردند. گروه کامپفروول ۱/۵، رتهایی که بعد از جراحی و کانول گذاری داخل بطن مغزی کامپفروول با دوز ۱/۵ میلی‌گرم به ازای هر رت دریافت کردند. گروه کامپفروول ۲، رتهایی که بعد از جراحی و کانول گذاری داخل بطن مغزی فقط کامپسایسین با دوز ۵ نانومول دریافت کردند. گروه کامپسازپین، رتهایی که بعد از جراحی و کانول گذاری داخل بطن مغزی فقط کامپسایسین با دوز ۱۰ نانومول دریافت کردند. گروه کامپسازپین + کامپفروول، رتهایی که بعد از جراحی و کانول گذاری داخل بطن مغزی کامپسایسین با دوز ۵ نانومول و کامپفروول با دوز ۱/۵ میلی‌گرم به ازای هر رت دریافت کردند. گروه کامپسازپین + کامپفروول، رتهایی که بعد از جراحی و کانول گذاری داخل بطن مغزی کامپسازپین با دوز ۱۰ نانومول و کامپفروول با دوز ۱/۵ میلی‌گرم به ازای هر رت دریافت کردند. تمامی داروهای مورد استفاده در آزمایش حاضر ساخت شرکت سیگما بودند.

در ابتدا رتها به دقت وزن شدند. سپس حیوان توسط تزریق درون صفاقی داروی کتابمنی  $\text{mg} / \text{kg}$  ۱۰۰ و زایلانین  $\text{mg} / \text{kg}$  ۱۰ بیهوش شدند. پس از قرار دادن حیوان بیهوش در دستگاه استریوتاکس، یک پد گرما زا برای حفظ درجه حرارت بدن رت در محدوده  $۰/۵ \pm ۰/۵$  مورد استفاده قرار گرفت. میله‌های دستگاه استریوتاکس در داخل گوش حیوان قرار داده شد و پس از مشاهده رفلکس چشمی، سر در دستگاه به گونه‌ای که سر کاملا در ناحیه میانی قرار بگیرید، ثابت گردید. همچنین یک پنبه خیس روی چشمان رت قرار داده می‌شد تا از خشک شدن چشم‌ها جلوگیری شود. سپس توسط پنس و قیچی پوست روی سر برداشته شد و در ادامه لایه‌های پوششی روی جمجمه برداشته شد تا نقطه برگما و لامیدا مشاهده گردید. پس از پیدا کردن مختصات مربوطه با استفاده از اطلس پاکسینوس سوراخی توسط مته دندانپزشکی در جمجمه ایجاد گردید، همچنین دو سوراخ در دو طرف محل کانول بر روی جمجمه جهت قرار گرفتن پیچ عینک برای ثابت کردن کانول توسط سیمان دندانپزشکی ایجاد شد. کانول گذاری در ناحیه بطن راست با مختصات  $\text{AP} = ۰/۸ \text{ mm}$ ,  $\text{ML} = ۱/۴ \text{ mm}$ ,  $\text{DV} = ۳ \text{ mm}$  انجام شد و کانول راهنمای توسط دستگاه استریوتاکس در داخل بطن راست مغز قرار گرفت. پیچ عینک ضدغوفونی شده و کانول توسط سیمان (آکریل دندان پزشکی) ثابت شد. برای جلوگیری از بسته شدن مجرای کانول یک سوزن آغشته به پارافین داخل مجرای کانول قرار گرفت. بعد از

مهمی که امروزه در درد مورد توجه است، فلاونوئیدها هستند که کامپفول یک فلاونوئید مهم مشتق از گیاهان دارویی می‌باشد که اثرات بالقوه آن به عنوان آنتی اکسیدان، ضد التهاب، ضد میکروبی، ضد سلطان، بهبود عملکرد قلب، محافظت‌کننده اعصاب، ضد اضطراب، ضد حساسیت و ضد درد به اثبات رسیده است [۶].

مطالعات قبلی بر روی تأثیر کامپفروول بر درد نوروپاتیک مشخص کرده است که کامپفروول سبب کاهش درد در موش‌های دیابتی می‌گردد [۸:۷]. با این وجود هنوز مکانیسم اثر کامپفروول بر روی درد به خوبی مشخص نشده است. از آنجا که نقش گیرنده‌های وانیلوئیدی نوع ۱ (TRPV1) روی درد به اثبات رسیده است و با توجه به اینکه تاکنون گزارش دقیقی در ارتباط با بررسی اثر متقابل گیرنده‌های وانیلوئیدی و کامپفروول در سیستم عصبی مرکزی روی درد ارائه نشده است، لذا در تحقیق حاضر اثرات ضد دردی ناشی از کامپفروول و ارتباط احتمالی آن با سیستم وانیلوئیدی از طریق تزریق داخل بطن مغزی کامپفروول و همچنین آگونیست و آنتاگونیست گیرنده‌های وانیلوئیدی نوع ۱ (TRPV1) و ارزیابی درد با تست‌های تیل فلیک، فرمالین و انقباضات شکمی مورد بررسی قرار گرفت.

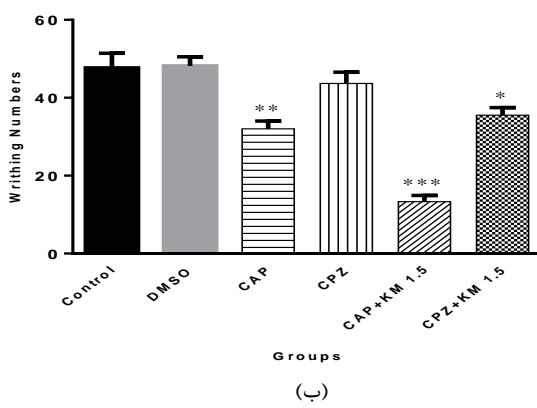
## مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی حاضر از ۶۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم که به طور تصادفی به ۱۰ گروه ۶ تابی تقسیم شده بودند، استفاده شد. رتها از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی همدان خریداری شدند و در شرایط استاندارد اتاق حیوانات تحت دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی (شروع دوره روشنایی از ساعت ۷:۰۰ صبح) و شرایط دمایی  $۲۲ \pm ۱$  درجه سانتیگراد نگهداری شدند. حیوانات با دسترسی آزاد به آب و غذای مخصوص در قفس‌های فلزی نگهداری می‌شدند. حیوانات حداقل ۲ ساعت قبل از انجام آزمایش به شرایط آزمایشگاه عادت داده شدند. آزمایش مورد نظر بین ساعت ۸:۰۰ صبح تا ۱۲:۰۰ ظهر انجام شد. آزمایشات بر طبق دستورالعمل‌های اخلاقی انجمن بین المللی مطالعه درد [۹] و نیز مصوبه کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی همدان با شناسه اختصاصی IR.UMSHA.REC.1397.585 در مورد حیوانات آزمایشگاهی انجام شد.

گروه‌های مورد مطالعه شامل گروه‌های؛ کنترل (سالین) بود، رتهایی که بعد از جراحی و کانول گذاری داخل بطن مغزی فقط سالین دریافت کردند. دی متیل سولفوکساید (DMSO) یا حلال، رتهایی که بعد از جراحی و کانول گذاری داخل بطن مغزی فقط دی متیل سولفوکساید یا حلال دریافت کردند. گروه مورفین (کنترل مثبت)، رتهایی که بعد از جراحی

مقایسه زمان پرش دم در بین گروههای مورد مطالعه: طبق آنالیزهای به دست آمده از آزمون واریانس یکطرفه و با توجه به نمودار ۲-الف، نتایج نشان داد که بین گروههای آزمایشی تفاوت معناداری وجود دارد ( $F = 11/68$ ,  $P < 0.001$ ). متعاقباً پس آزمون توکی نشان داد که تزریق دوز  $1/5$  میلی گرم بر رت کامپفروول سبب کاهش درد در موش‌های صحرایی نسبت به گروههای کنترل و DMSO گردید. چنانچه مدت زمان عکس‌العمل پرش دم در موش‌های صحرایی (*Tail-flick*) را از  $2/8 \pm 0.07$  ثانیه به  $0.79 \pm 0.09$  ثانیه رساند (*Latency*). این در حالی است که استفاده از دوزهای  $1/5$  و  $1/10$  میلی گرم کامپفروول در این تست اثر ضد دردی معناداری را در مقایسه با گروههای کنترل و DMSO نشان ندادند. همچنین این پس آزمون نشان داد تزریق مورفین سبب کاهش معنادار درد در مقایسه با گروههای کنترل و DMSO می‌گردد چنانچه زمان عکس‌العمل پرش دم در رت‌ها را از  $2/8 \pm 0.05$  ثانیه در گروه کنترل به  $0.9 \pm 0.02$  ثانیه رساند ( $P < 0.001$ ).

طبق آنالیزهای به دست آمده از آزمون واریانس یکطرفه و با توجه به نمودار ۲-ب، نتایج نشان داد که بین گروههای آزمایشی تفاوت معناداری وجود دارد ( $F = 6/821$ ,  $P = 0.0005$ ) ( $F = 5/24$ ). متعاقباً پس آزمون توکی نشان داد که تزریق کاپسایسین به همراه دوز  $1/5$  میلی گرم بر رت کامپفروول سبب کاهش درد در موش‌های صحرایی نسبت به گروه‌های کنترل و DMSO گردید ( $P < 0.01$ ). چنانچه مدت زمان عکس‌العمل پرش دم در موش‌های صحرایی (*Tail-flick Latency*) را از کاپسازیین به تنهایی به رت‌های نر سبب کاهش درد در موش‌های صحرایی نسبت به گروههای کنترل و DMSO گردید ( $P < 0.05$ ). این در حالی است که استفاده از کاپسازیین به همراه دوز  $1/5$  میلی گرم کامپفروول در این تست اثر ضد دردی معناداری را در مقایسه با گروههای کنترل و DMSO نشان نداد.



(ب)

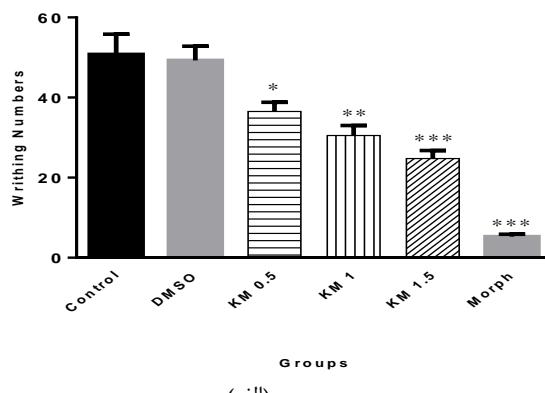
**نمودار ۱:** الف: مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف کامپفروول با دوزهای  $1/5$  و  $1/10$  میلی گرم بر رت در تست درد انقباضات شکمی ناشی از اسید استیک. ب: مقایسه میانگین تعداد انقباضات شکمی ناشی از اسید استیک با غلظت  $1/5$  میلی گرم بر رت به همراه شناسایی مکانیسم وانیلوئیدی. KM: کامپفروول. CAP: مورفین. CPZ: کاپسایسین. Morph: مورفین. آزمایشگاهی در هر گروه = ۶

پایان کانول گذاری دوره ریکاوری سپری شد و ۷ روز به رت‌ها استراحت داده شد تا استرس جراحی بطرف شده و تزریق‌ها و آزمایش‌های لازم انجام شود [۱۱، ۱۰] (برای تهیه کانول راهنمای سوزن شماره ۲۳ به طول ۱۰ میلی‌متر و برای تهیه کانول تزریقی سوزن دندان پزشکی شماره ۳۰ به طول ۱۱ میلی‌متر بریده شد).

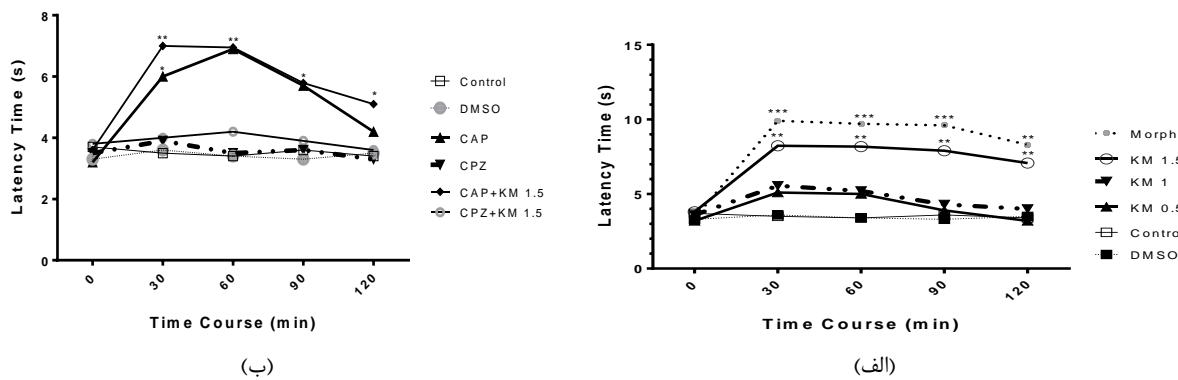
## یافته‌ها

مقایسه تعداد انقباضات شکمی در بین گروههای مورد مطالعه: طبق تجزیه و تحلیل‌های به دست آمده از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و با توجه به نمودار ۱-الف، نتایج نشان داد که بین گروههای آزمایشی تفاوت معناداری وجود دارد [ $F = 31/46$ ] ( $F = 9, 5/0$ ). متعاقباً پس آزمون توکی نشان داد که تزریق دوزهای  $1/5$  و  $1/10$  میلی گرم بر رت کامپفروول به ترتیب با  $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$  و  $P < 0.05$  سبب کاهش تعداد انقباضات شکمی موش‌های صحرایی نسبت به گروههای سالین و DMSO گردیدند. همچنین این پس آزمون نشان داد، تزریق مورفین سبب کاهش معنادار درد در مقایسه با گروههای سالین و DMSO گردید ( $P < 0.001$ ).

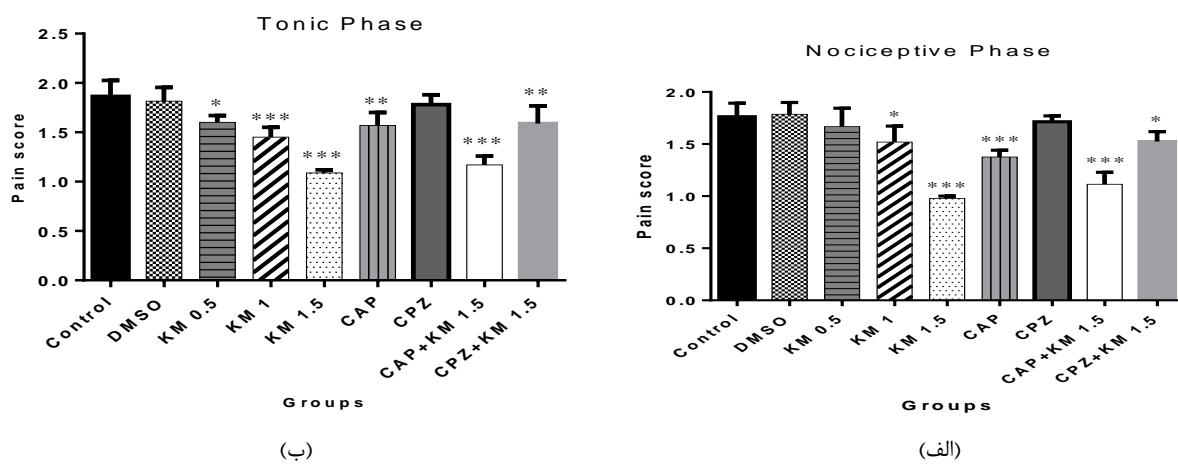
همچنین طبق تجزیه و تحلیل‌های به دست آمده از آزمون واریانس یکطرفه و با توجه به نمودار ۱-ب، نتایج نشان داد که بین گروههای آزمایشی تفاوت معناداری وجود دارد [ $F = 48/46$ ] ( $F = 9, 5/0$ ). متعاقباً پس آزمون توکی نشان داد که تزریق کاپسایسین به تنهایی و نیز استفاده توأم کاپسایسین به همراه دوز بالای کامپفروول ( $1/5$  میلی گرم بر رت) در مقایسه با گروههای سالین و DMSO تفاوت معناداری دارد ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ ). همچنین این پس آزمون نشان داد، تزریق توأم کاپسازیین به همراه دوز بالای کامپفروول ( $1/5$  میلی گرم بر رت) در مقایسه با گروههای سالین و DMSO تفاوت معناداری دارد ( $P < 0.05$ ).



(الف)



**نمودار ۲:** الف: مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف کامپفروول با دوزهای  $0/5$ ،  $1$  و  $1/5$  میلی‌گرم بر رت در تست درد تیل فلیک. ب: مقایسه میانگین عقب کشیدن دم رت نر با غلظت  $1/5$  میلی‌گرم کامپفروول به همراه شناسایی مکانیسم و اندیوئیدی در تست درد تیل فلیک. Morph: کامپفروول، KM: کامپفروول، CAP: کپسایسین، CPZ: کپسازین، CP: کپسازین، CPZ+KM: کپسازین با گروه‌های کنترل و DMSO. تعداد حیوانات آزمایشگاهی در هر گروه = ۶



**نمودار ۳:** الف: مقایسه میانگین نمره درد با غلظت‌های مختلف کامپفروول با دوزهای  $0/5$ ،  $1$  و  $1/5$  میلی‌گرم بر رت و همچنین مقایسه میانگین نمره درد با غلظت  $1/5$  میلی‌گرم کامپفروول به همراه شناسایی مکانیسم و اندیوئیدی در آزمون درد با فرمالین در فاز Nociceptive (فاز ۱) ب: مقایسه میانگین نمره درد با غلظت‌های مختلف کامپفروول با دوزهای  $0/5$ ،  $1$  و  $1/5$  میلی‌گرم بر رت و همچنین مقایسه میانگین نمره درد با غلظت  $1/5$  میلی‌گرم کامپفروول به همراه شناسایی مکانیسم و اندیوئیدی در آزمون درد با فرمالین در فاز Tonic (فاز ۲). CAP: کامپفروول، CPZ: کپسایسین، CP: کپسازین، DMSO: کپسازین. تعداد حیوانات آزمایشگاهی در هر گروه = ۶

کاهش امتیاز درد گردد. از سویی تزریق کپسازین به صورت توانم با کامپفروول با دوز  $1/5$  میلی‌گرم توانست نسبت به گروه‌های کنترل و DMSO سبب کاهش امتیاز درد گردد. ( $P < 0/05$ )

طبق آنالیزهای به دست آمده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و با توجه به نمودار ۳-ب، در فاز دوم تست فرمالین، نتایج نشان داد که بین گروه‌های آزمایشی تفاوت معنا داری وجود دارد ( $F(8,45) = 29/63$ ،  $P < 0/0001$ ). متعاقباً پس آزمون توکی نشان داد که در فاز دوم تست فرمالین، تزریق دوزهای  $0/5$ ،  $1$  او  $1/5$  میلی‌گرم بر رت کامپفروول سبب کاهش درد در موش‌های صحرایی نسبت به گروه‌های کنترل و DMSO گردید (به ترتیب با:  $P < 0/05$ ،  $P < 0/01$  و  $P < 0/001$ ). همچنین در فاز دوم تست فرمالین مشخص شد که

مقایسه نمره درد گروه‌های مورد مطالعه در تست فرمالین: طبق آنالیزهای به دست آمده از آزمون واریانس یک طرفه و با توجه به نمودار ۳-الف، نتایج نشان داد که بین گروه‌های آزمایشی تفاوت معناداری وجود دارد ( $F(8,45) = 38/51$ ،  $P < 0/0001$ ). ( $F(8,45)$ )

متعاقباً پس آزمون توکی نشان داد که در فاز اول تست فرمالین، تزریق دوزهای  $1$  و  $1/5$  میلی‌گرم بر رت کامپفروول سبب کاهش درد در موش‌های صحرایی نسبت به گروه‌های کنترل و DMSO گردید (به ترتیب با:  $P < 0/05$ ،  $P < 0/01$  و  $P < 0/001$ ). همچنین در فاز اول تست فرمالین مشخص شد که تزریق کپسایسین به تنها بیانی با  $P < 0/001$  و تزریق کپسازین به صورت توانم با کامپفروول با دوز  $1/5$  میلی‌گرم با  $P < 0/001$  توانست نسبت به گروه‌های کنترل و DMSO سبب

کپسایسین به تنها یی نداشت. گروه دریافت کننده‌ی کپسازپین-کامپفروول به طور قابل توجهی با گروه کامپفروول تفاوت داشت و مانع ایجاد بی دردی توسط کامپفروول شد و تأخیر در کشش دم را به ۴ ثانیه کاهش داد. اثر کنترلی مورفین بلافلصله بعد از تزریق شروع و تا پایان تست ادامه داشت و در دقیقه ۹۰ به اوج اثر خود رسید.

تست رایزینگ یک مدل ویژه به منظور جستجو و شناسایی اثرات ضد دردی و ضدالتهابی داروهای جدید می‌باشد. همچنین تست رایزینگ یک تحریک شیمیایی است که به طور گستردۀ به منظور ارزیابی فعالیت ضد دردی محیطی استفاده می‌شود [۱۷]. تزریق کامپفروول سبب کاهش معنادار تعداد انقباضات شکمی گردید. بنابراین می‌توان این گونه استنباط کرد که اثر ضد دردی کامپفروول احتمالاً از طریق مکانیسم‌های محیطی حمایت می‌گردد. کامپفروول سیکلواکسیژناز-۲ را مهار می‌کند و می‌تواند درد التهابی از جمله درد التهابی ناشی از تزریق استیک اسید را کاهش دهد (تزریق استیک اسید میزان سیکلواکسیژناز-۲ را که یکی از فاکتورهای التهابی می‌باشد افزایش می‌دهد) [۱۸].

تزریق داخل بطن مغزی کپسایسین در مقایسه با گروه کنترل به میزان مؤثری باعث کاهش درد احشایی در تست انقباضات شکمی شده است که نشان‌دهنده اثرات ضد درد محیطی این دارو با مکانیسم مرکزی است. اثر ضد درد کپسایسین در مقایسه با گروه کامپفروول تفاوت معناداری نداشت و تقریباً به یک اندازه در کاهش درد مؤثر بودند. کپسایسین با مکانیسم داخل سلولی باعث افزایش فعالیت گیرنده‌های TRPV1 می‌شود و از بروز درد جلوگیری می‌کند [۱۹]. تزریق توم کپسازپین و کامپفروول به میزان قابل توجهی با گروه کامپفروول تفاوت داشت. به این معنا که کپسازپین توانایی بلوك گیرنده کامپفروول را دارد که مانع اثر ضد دردی کامپفروول شده، اما مکانیسم دخیل در ایجاد این بلوك مشخص نیست؛ اما تزریق کپسایسین به عنوان پیش دارو قبل از تزریق کامپفروول اثر تقویتی در کاهش درد نداشت.

تست فرمالین به طور وسیعی در جوندگان، به عنوان یک مدل درد شیمیایی حاد و مزمن به منظور شناسایی داروهایی با پتانسیل ضدردی استفاده می‌شود [۲۰]. تزریق زیرجلدی فرمالین رقیق شده به کف پای موش صحرایی سبب ایجاد رفتارهای القا شده به واسطه درد چون: لیسدن، جویدن، بلند کردن پای عقبی می‌گردد. عموماً این رفتارهای ناشی از درد در طی دو فاز بعد از تزریق فرمالین مشاهده می‌شوند. فاز اول بلافلصله کوتاهی به پایان می‌رسد و عقیده بر این است که مدت زمان کوتاهی به پایان می‌رسد و عقیده بر این است که این فاز تحت اثر فیبرهای آوران اولیه می‌باشد. فاز دوم ۱۰ دقیقه پس از تزریق فرمالین مشاهده و تا دقیقه ۶۰ ادامه می‌یابد و گمان می‌رود به دلیل بالا رفتن فعالیت نورون‌های

تزریق کپسایسین به تنها یی با  $P < 0.01$  و تزریق کپسایسین به صورت توم با کامپفروول با دوز ۱/۵ میکروگرم با  $P < 0.01$  توانست نسبت به گروه‌های کنترل و DMSO سبب کاهش امتیاز درد گردد. از سویی تزریق کپسازپین به صورت توم با کامپفروول با دوز ۱/۵ میلی‌گرم توانست نسبت به گروه‌های کنترل و DMSO سبب کاهش امتیاز درد گردد ( $P < 0.01$ ).

## بحث

در این مطالعه تجربی مشخص شد کامپفروول احتمالاً می‌تواند از طریق مسیر گیرنده‌های وانیلوئیدی نوع ۱ (TRPV1) سبب کاهش درد شود. امروزه مشخص شده علاوه بر ضد دردهای شناخته شده‌ای همچون اوپیوئیدها و ضد التهاب‌های غیر استروئیدی، گیرنده‌ی TRPV1 و کامپفروول نیز می‌توانند در کاهش درد مؤثر باشند [۱۲، ۷]. گیرنده‌ی TRPV1 یکی از سیستم‌های مؤثر بر کنترل درد است که در مناطق مرتبط با کنترل درد در سیستم عصبی مرکزی بیان شده و عوامل گوناگونی از جمله کپسایسین (عصاره فلفل قرمز) تند این گیرنده را فعال می‌کنند. بیان کامپفروول در مناطق مرتبط با درد در سیستم عصبی مرکزی از جمله ماده خاکستری دور قناتی یا PAG، بیانگر نقش آن در تنظیم درد است [۱۳].

تست پرش دم به طور گستردۀ وسیعی به منظور مطالعات درد، شناخت فعالیت ضد دردی و گسترش تحمل نسبت به داروهای اوپیوئیدی استفاده می‌گردد. دقت و حساسیت اندازه‌گیری در این تست بیانگر این مطلب است که این تست بدون شک جزو مهم‌ترین تست‌های استاندارد در این زمینه است [۱۵، ۱۴]. نتایج حاصل از تست پرش دم نشان داد که تزریق مرکزی کامپفروول باعث کاهش معناداری در میزان درد گردید. از آنجا که تست پرش دم به منظور بررسی رفلکس‌های نخاعی و شناسایی مسیر ضد دردی مرکزی استفاده می‌شود، می‌باشد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تزریق داخل بطن مغزی کپسایسین بر کنترل مرکزی درد تأثیر دارد و اثرات ضد دردی مؤثری داشت و با مطالعات انجام شده جهت بررسی اثر مرکزی کپسایسین بر درد توسط ارزیابی با تست پرش دم مطابقت دارد چنانچه در این مطالعات گزارش شده گیرنده‌ی TRPV1 موجود در PAG خلفی با سیستم نزولی درد ارتباط دارد [۱۶]. تزریق کامپفروول پاسخ‌های ناشی از درد را به میزان قابل توجهی کاهش داد. شروع اثر کامپفروول حدود پنج دقیقه بعد از تزریق شروع و در دقیقه ۶۰ به اوج اثر خود رسید و دو ساعت بعد از تزریق اثر آن به حداقل خود رسید و نشان داد اثر کامپفروول وابسته به زمان می‌باشد. کامپفروول در ترکیب با آگونیست گیرنده وانیلوئیدی اثر قابل توجهی در کنترل درد نسبت به گروه دریافت کننده‌ی کامپفروول و

و ایجاد بی دردی می شود [۲۵]. گزارش شده است که فعال شدن گیرندهای G<sub>q</sub>-پروتئین (GqPCRs)، از جمله گیرندهای mGlu I، با فعال کردن PLC، دی آسیل گلیسرول (DAG) تولید می کنند. مطالعات دیگر جهت بررسی نقش احتمالی گیرندهای TRPV1 موجود در PAG بر درد که در مسیر نزولی درد قرار دارند نشان داد که تزریق کپسایسین به داخل PAG باعث افزایش تأخیر در پاسخ نسبت به محرک های دردناک و آزاد سازی گلوتامات در PAG در در موش صحرایی می شود، اثری که توسط آنتاگونیست های گیرنده گلوتامات (mGlu) متوقف می شود [۲۶]. همچنین طبق مطالعه Liao در سال ۲۰۱۲ فعال سازی گیرندهای TRPV1 توسط کپسایسین به وسیله افزایش DAG از طریق فعالسازی مسیر PLC منجر به آزاد سازی گلوتامات از پایانه های گلوتاماتریزیک می شود که این نتیجه به دلیل مسیر فعالیت مشترک این دو گیرنده می باشد و نهایتاً این وقایع باعث فعال شدن مسیر نزولی کنترل درد می شوند [۲۷].

در سال ۲۰۰۹ Marzo TRPV1، کپسایسین (3 nmol/rat) و آگونیست گیرنده ای انکفالین [D-Ala(2),NMe-Phe(4),Gly(5)-ol] (6 pmol/rat)، زمانی که به صورت همزمان در PAG شکمی آزمون درد حرارتی؛ ۲) تحریک انتشار گلوتامات به (rostral) RVM ventromedial medulla سلول های روشن در RVM. RVM در روشن در RVM که همه این اثرات توسط آنتاگونیست گیرندهای TRPV1 و اوپیوئیدی ۵-iodo-5-زینیفراتوكسین و نالوسان، به ترتیب بلوک شدند [۲۸]. بنابراین گیرنده وانیلوئیدی نوع یک از طریق تعامل با اوپیوئیدها و گلوتامات می تواند اثر مهاری بر درد داشته باشد. اما طبق نتایج مطالعه حاضر ترکیب آگونیست گیرنده ای وانیلوئیدی نوع یک با کامپفرون اثر مهاری تقویتی بر روی درد نداشتند. نتایج تحقیق حاضر توایی کامپفرون در کنترل درد را تأیید می کند. همچنین مطالعات نشان می دهد که تزریق مرکزی کامپفرون با سیستم درون زاد کنترل درد تعامل دارد که نشان دهنده فعالیت مرکزی کامپفرون است و این نتیجه با گزارش های ارائه شده در مطالعات قبلی مرتبط با فلاونوئید های مشابه مطابقت دارد [۳۲-۳۹].

### نتیجه گیری

در مطالعه حاضر، اثر ترکیب کامپفرون با آگونیست و آنتاگونیست گیرنده های TRPV1 و تعامل کامپفرون داخل بطن مغزی با گیرنده های TRPV1 را بررسی کردیم. هر دو گیرنده ای وانیلوئیدی نوع یک و کامپفرون از طریق افزایش فسولیپاز C فعال می شوند. همچنین آنتاگونیست گیرنده های

دردزای نخاعی ایجاد شود [۲۱]. در فاز دوم مدیاتورهای مختلفی تولید و آزاد می شوند و سبب برانگیخته شدن پاسخهای التهابی شده و همبستگی زیادی با افزایش تولید پروستاگلاندین ها و القاء سیکلواکسیژنазها دارد. نتایج حاصل از تست فرمالین نشان از اثر ضددردی کامپفرون دارد که بر اساس این نتایج می توان اظهار داشت که با دوز مورد نظر توانسته اثر مهاری خود در فاز حاد و مزمن درد را از طریق مهار مدیاتورهای التهابی نظیر سیکلواکسیژناز-۲ اعمال نماید. تزریق کپسایسین در فاز دوم اثر ضد دردی بیشتری نسبت به فاز اول اعمال کرد. تزریق مرکزی کپسایسین که یک آگونیست گیرنده وانیلوئید نوع ۱ (TRPV1) است می شود از طریق تحریک مسیرهای نزولی ضد درد سبب کاهش درد می شود [۲۲]. گروه کپساپین-کامپفرون نسبت به گروه کامپفرون تفاوت معناداری داشت و اثر ضددردی کامپفرون مهار شد. شواهد موجود از جمله مطالعه حاضر، نشان می دهد که گیرنده ای TRPV1 و کامپفرون می توانند در میان عوامل ضد درد قرار بگیرد. گیرنده TRPV1 با اتصال به پروتئین Gq (یک زیر واحد پروتئین G است) فسفولیپاز C را فعال می کند که این آنزیم با هیدرولیز IP<sub>3</sub> و PIP<sub>2</sub> DAG را تشکیل می دهد. در ادامه توسط دی آسیل گلیسرول لیپاز (DAGL) به ۲-آرشیدونیل گلیسرول گلیسرول (2-AG) تبدیل و ۲-AG تحت یک فرآیند خود به خودی با جایه جایی گروه آسیل به ۱-آرشیدونیل گلیسرول TRPV1 (1-AG) تبدیل می شود. هم ۲-AG و هم ۱-AG را فعال می کنند. فعالیت این دو توسط آنزیم های مونو آسیل گلیسرول لیپاز (MAGL) و آلفا بتا هیدرولاز دومین (ABHD 6,12) خاتمه می یابد. فعالیت TRPV1 به طور غیر مستقیم توسط PKC نیز تنظیم می شود (وابسته به فسفریله شدن کاتال یونی). همچنین تولید IP<sub>3</sub> باعث آزاد شدن کلسیم از میتوکندری و شبکه اندوپلاسمی و فعال شدن کلسیم کالمودولین وابسته به پروتئین کیناز-۲ می شود. طبق تحقیقات Zygmont Mهار MAGL در مغز منجر به کاهش درد می شود [۲۳]. به کاربردن سیستمیک JZL184 (بلوک کننده ای آنزیم مونو آسیل گلیسرول لیپاز) باعث افزایش سطح 2-AG در مغز می شود [۲۲]. همچنین با تزریق داخل مغزی فعال کننده های گیرنده های TRPV1 بی دردی ایجاد می شود. مطابق با نتایج مطالعه ای حاضر می باشد [۲۴]. با تزریق داخل بطن مغزی JZL184 با دوز 10 nmol با دوز 100 nmol مغزی قبل از تزریق فرمالین به کف پای موش به طور معناداری پاسخهای ناشی از درد را مهار کرده که این اثر با تزریق 10 nmol کپساپین به همراه JZL184 از بین می رود همچنین تزریق JZL184 در موس هایی که به صورت ژنتیکی فاقد گیرنده های TRPV1 بودند باعث کاهش درد نشد [۲۲]. JZL184 به عنوان یک مهار کننده ای قوی و انتخابی برای MAGL سطوح 2-AG و 1-AG را افزایش می دهد و باعث افزایش فعالیت گیرنده های TRPV1

دانشگاه علوم پزشکی همدان سپاسگزاری می‌نمایند.

### تضاد منافع

این مطالعه برای نویسنده‌گان هیچگونه تضاد منافعی نداشته است.

### ملاحظات اخلاقی

این مطالعه در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی همدان به شناسه اختصاصی IR.UMSHA.REC.1397.585 مورد تأیید قرار گرفته است.

### سهم نویسنده‌گان

محمد زارعی در طراحی و تحلیل پژوهش، نگارش و ویرایش مقاله و زهره ایزدی دستنایی و سجاد جباری در جمع آوری داده‌های این پژوهش نقش داشته‌اند.

### حمایت مالی

پژوهش حاضر با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان با کد طرح ۹۷۰۹۲۷۵۷۵۳ انجام شده است.

### REFERENCES

- Huang T, Lin S-H, Malewicz NM, Zhang Y, Zhang Y, Goulding M, et al. Identifying the pathways required for coping behaviours associated with sustained pain. *Nature*. 2019;565(7737):86.
- Liu N-J, Storman EM, Gintzler AR. Pharmacological modulation of endogenous opioid activity to attenuate neuropathic pain in rats. *The Journal of Pain*. 2019;20(2):235-43.
- Zarei M, Mohammadi S, Shahidi S, Fallahzadeh AR. Effects of Sonchus asper and apigenin-7-glucoside on nociceptive behaviors in mice. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*. 2017;5(4):227-37.
- Golshani Y, Zarei M, Mohammadi S. Acute/chronic pain relief: Is Althaea officinalis essential oil effective. *Avicenna Journal of Neuro Psych Physiology*. 2015;2(4).
- Fallahzadeh A, Mohammadi S. An investigation of the antinociceptive and anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract of Inula helenium on male rats. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2016;18(12):57-63.
- Imran M, Rauf A, Shah ZA, Saeed F, Imran A, Arshad MU, et al. Chemo-preventive and therapeutic effect of the dietary flavonoid kaempferol: A comprehensive review. *Phytotherapy research*. 2019;33(2):263-75.
- Abo-Salem OM. Kaempferol attenuates the development of diabetic neuropathic pain in mice: Possible anti-inflammatory and anti-oxidant mechanisms. *Macedonian Journal of Medical Sciences*. 2014;7(3):424-30.
- Kishore L, Kaur N, Singh R. Effect of Kaempferol isolated from seeds of Eruca sativa on changes of pain sensitivity in Streptozotocin-induced diabetic neuropathy. *Inflammopharmacology*. 2018;26(4):993-1003.
- Goldberg DS, McGee SJ. Pain as a global public health priority. *BMC public health*. 2011;11(1):1.
- Mohammadi S, Golshani Y. Neuroprotective Effects of Rhamnazin as a Flavonoid on Chronic Stress-Induced Cognitive Impairment. *Journal of Advanced Neuroscience Research*. 2017;4:30-7.
- Wang x, Yu z, He z, Zhang q, Yu s. Intracerebroventricular infusion of D-serine decreases nociceptive behaviors induced by electrical stimulation of the dura mater of rat. *Neurological research*. 2019;41(3):204-7.
- Christoph T, Grünweller A, Mika J, Schäfer MK-H, Wade EJ, Weihe E, et al. Silencing of vanilloid receptor TRPV1 by RNAi reduces neuropathic and visceral pain in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;350(1):238-43.
- Jara-Oseguera A, Simon SA, Rosenbaum T. TRPV1: on the road to pain relief. *Current molecular pharmacology*. 2008;1(3):255-69.
- Mahmoodi M, Mohammadi S, Zarei M. Antinociceptive effect of hydroalcoholic leaf extract of tribulus terrestris L. in male rat. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2013;15(6):36-43.
- Zhou Q, Bao Y, Zhang X, Zeng L, Wang L, Wang J, et al. Optimal interval for hot water immersion tail-flick test in rats. *Acta neuropsychiatrica*. 2014; 26(4):218-22.
- McGaraughty S, Chu KL, Bitner RS, Martino B, Kouhen RE, Han P, et al. Capsaicin infused into the PAG affects rat tail flick responses to noxious heat and alters neuronal firing in the RVM. *Journal of neurophysiology*. 2003;90(4):2702-10.

توانست اثر ضد درد کامپفروول را بلوک کند و این احتمال وجود دارد که اثر ضد درد کامپفروول توسط مسیر وانیلوئیدی حمایت و تنظیم می‌شود. طبق نتایج نشان داده شد که کامپفروول می‌تواند اثر ضد درد وابسته به زمان را در مosh القا کند. طبق نتایج ما گیرنده کامپفروول و گیرنده های TRPV1 هر دو در کنترل در حاد نقش دارند که با نتایج مطالعات قبلی مطابقت دارد. اما اثر تقویتی بر کنترل درد ندارند. این مطالعه اطلاعات جدیدی را برای مطالعه بیشتر مبانی مربوط به مکانیسم اثرات آنتاگونیستی ارائه می‌دهد و اطلاعاتی را ارائه می‌دهد که دارو درمانی ترکیبی که کپساپیسین و کامپفروول را در سیستم عصبی مرکزی هدف قرار می‌دهد در کاهش هیپرآلزی‌های حرارتی و شیمیایی بی اثر است؛ اما با تأثیر آنتاگونیست این گیرنده برعکرد کامپفروول نشان داده شد که مسیر وانیلوئید در ایجاد اثر ضد درد کامپفروول مؤثر است.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی ثبت شده در معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان با شماره طرح ۹۷۰۹۲۷۵۷۵۳ می‌باشد. نویسنده‌گان این مقاله از تمامی افراد دخیل در مرکز تحقیقات فیزیولوژی اعصاب و گروه فیزیولوژی

17. Asgari Neamatian M, Yaghmaei P, Mohammadi S. Assessment of the antinociceptive, antiinflammatory and acute toxicity effects of *Ducrosia anethifolia* essential oil in mice. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences*. 2017; 22(3):74-84.
18. García-Mediavilla V, Crespo I, Collado PS, Esteller A, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ, et al. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *European journal of pharmacology*. 2007;557(2-3):221-9.
19. Cobzaru A. High-concentration capsaicin patch (qutenza)-a new step in treatment of neuropathic pain. *Amaltea Medical*, Editura Magister; 2012.
20. Zarei M, Mohammadi S, Komaki A. Antinociceptive activity of *Inula britannica* L. and patuletin: In vivo and possible mechanisms studies. *Journal of ethnopharmacology*. 2018;219:351-8.
21. Komatsu T, Katsuyama S, Takano F, Okamura T, Sakurada C, Tsuzuki M, et al. Possible involvement of the  $\mu$  opioid receptor in the antinociception induced by sinomenine on formalin-induced nociceptive behavior in mice. *Neuroscience letters*. 2019;699:103-8.
22. Zygmunt PM, Ermund A, Movahed P, Andersson DA, Simonsen C, Jönsson BA, et al. Monoacylglycerols activate TRPV1—a link between phospholipase C and TRPV1. *PLoS One*. 2013;8(12):e81618.
23. Zygmunt PM, Ermund A, Movahed P, Andersson DA, Simonsen C, Jönsson BA, et al. Monoacylglycerols activate TRPV1—a link between phospholipase C and TRPV1. 2013;8(12):e81618.
24. Mallet C, Barrière DA, Ermund A, Jönsson BA, Eschalier A, Zygmunt PM, et al. TRPV1 in brain is involved in acetaminophen-induced antinociception. *PLoS one*. 2010;5(9):e12748.
25. Guindon J, Blanton H, Rodriguez-Garcia D, Lugo I, Lilley J, Brelsfoard J. (282) Sex Differences in the Development of Tolerance to Arachidonyl-2-Chloroethylamide (ACEA) in the Mouse Formalin Pain Model. *The Journal of Pain*. 2019;20(4):S45.
26. Pingle S, Matta J, Ahern G. Capsaicin receptor: TRPV1 a promiscuous TRP channel. *Transient Receptor Potential (TRP) Channels*: Springer; 2007. p. 155-71.
27. Liao HT, Lee HJ, Ho YC, Chiou LC. Capsaicin in the periaqueductal gray induces analgesia via metabotropic glutamate receptor-mediated endocannabinoid retrograde disinhibition. *British journal of pharmacology*. 2011;163(2):330-45.
28. Marzo VD, Starowicz K, Cristino L. TRPV1 receptors in the central nervous system: potential for previously unforeseen therapeutic applications. *Current pharmaceutical design*. 2008;14(1):42-54.
29. Xu N, Wang H, Fan L, Chen Q. Supraspinal administration of apelin-13 induces antinociception via the opioid receptor in mice. *Peptides*. 2009; 30(6):1153-7.
30. Lv S-Y, Yang YJ, Hong S, Wang N-B, Qin Y-J, Li W-X, et al. Intrathecal apelin-13 produced different actions in formalin test and tail-flick test in mice. *Protein and peptide letters*. 2013;20(8):926-31.
31. Lv S-Y, Qin Y-J, Wang N-B, Yang Y-J, Chen QJP. Supraspinal antinociceptive effect of apelin-13 in a mouse visceral pain model. 2012;37(1):165-70.
32. Xu N, Wang H, Fan L, Chen QJP. Supraspinal administration of apelin-13 induces antinociception via the opioid receptor in mice. 2009;30(6):1153-7.