

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

Mohammad Zarei (PhD)<sup>1,\*</sup> , Zohre Izadi Dastenaeei (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: zareim@umsha.ac.ir

### Abstract

**Received:** 07/01/2020

**Accepted:** 06/02/2020

#### How to Cite this Article:

Zarei M, Izadi Dastenaeei 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 کامپفرول: 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 زیست شناسی، 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

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۱۰/۱۷

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۱۱/۱۷

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی همدان محفوظ است.

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

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه‌ی تجربی، تعداد ۶۰ سر رت نر نژاد ویستار (۲۵۰-۲۰۰ گرم) به گروه‌های سالین یا کنترل، دی متیل سولفوکساید (DMSO) یا حلال، مورفین، کپسایسین، کپسازپین، کامپفرول با دوزهای ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر رت، کپسایسین+ کامپفرول با دوز ۱/۵ میلی‌گرم بر رت و کپسازپین+ کامپفرول 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 توسط تست‌های ارزیابی‌کننده درد (تست پرش دم، تست انقباضات شکمی و تست فرمالین) مورد آزمایش قرار گرفتند. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و پس آزمون توکی با هم مقایسه شدند.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد در تست‌های پرش دم، انقباضات شکمی و فرمالین کامپفرول اثرات ضد دردی معناداری در مقایسه با گروه‌های سالین و حلال داشت ( $P<0/01$ ). تزریق توأم کپسایسین و کامپفرول با دوز ۱/۵ میلی‌گرم بر رت هم اثر ضد دردی معناداری در مقایسه با گروه کامپفرول ۱/۵ میلی‌گرم بر رت نشان داد؛ اگرچه هم افزا نبود ( $P<0/05$ ). علاوه بر این، بکارگیری همزمان کپسازپین و کامپفرول با دوز ۱/۵ میلی‌گرم بر رت اثرات ضد دردی کامپفرول را کاهش داد ( $P<0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** کامپفرول 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:** کامپفرول؛ گیرنده‌ی وانیلوئیدی نوع یک؛ درد؛ سیستم عصبی مرکزی

## مقدمه

همراه هستند که در مجموع باعث شده است انسان به دنبال داروهای جدیدتری باشد 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 مؤثره‌ی موجود در گیاهان دارویی و جلوگیری از انباشته 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 [۵،۴]. 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 سنین 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 اویپوئیدی استفاده می‌شود که این داروها دارای عوارض جانبی نسبتاً زیادی بوده و با بروز اختلالات در دستگاه گوارش، آسیب‌های کلیوی و یا با وابستگی

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

مطالعات قبلی بر روی تأثیر کامپفرول بر درد نوروپاتیک مشخص کرده است که کامپفرول سبب کاهش درد در موش‌های دیابتی می‌گردد [۸،۷]. با این وجود هنوز مکانیسم اثر کامپفرول 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 کامپفرول در سیستم عصبی مرکزی روی درد ارائه نشده است، لذا در تحقیق حاضر اثرات ضد دردی ناشی از کامپفرول و ارتباط احتمالی آن با سیستم وانیلوئیدی از طریق تزریق داخل بطن مغزی کامپفرول 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 تایی 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  $22 \pm 1$  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 ساعات ۸:۰۰ صبح تا ۱۲:۰۰ ظهر انجام شد. آزمایشات بر طبق دستورالعمل‌های اخلاقی انجمن بین‌المللی 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.

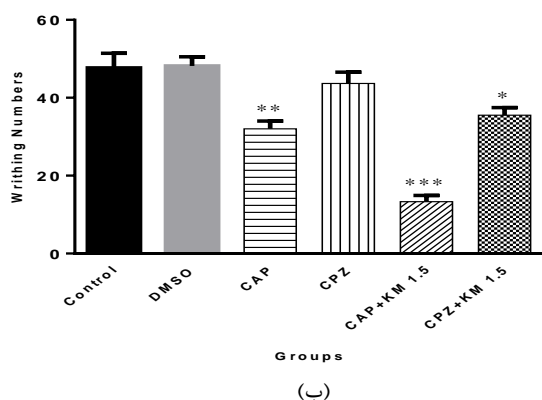
گروه‌های مورد مطالعه شامل گروه‌های؛ کنترل (سالین) بود، رت‌هایی که بعد از جراحی و کانول‌گذاری داخل بطن مغزی فقط سالین دریافت کردند. دی متیل سولفوکساید (DMSO) یا حلال، رت‌هایی که بعد از جراحی و کانول‌گذاری داخل بطن مغزی فقط دی متیل سولفوکساید یا حلال دریافت کردند. گروه مورفین (کنترل مثبت)، رت‌هایی که بعد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

و کانول‌گذاری داخل بطن مغزی فقط مورفین با دوز مؤثر ۱۰ میکروگرم به ازای هر رت دریافت کردند. گروه کامپفرول ۰/۵، رت‌هایی که بعد از جراحی و کانول‌گذاری داخل بطن مغزی فقط کامپفرول با دوز ۰/۵ میلی‌گرم به ازای هر رت دریافت کردند. گروه کامپفرول ۱، رت‌هایی که بعد از جراحی و کانول‌گذاری داخل بطن مغزی کامپفرول با دوز ۱ میلی‌گرم به ازای هر رت به ازای هر رت دریافت کردند. گروه کامپفرول ۱/۵، رت‌هایی که بعد از جراحی و کانول‌گذاری داخل بطن مغزی کامپفرول با دوز ۱/۵ میلی‌گرم به ازای هر رت دریافت کردند. گروه کاپسایسین، رت‌هایی که بعد از جراحی و کانول‌گذاری داخل بطن مغزی فقط کاپسایسین با دوز ۵ نانومول دریافت کردند. گروه کاپسازپین، رت‌هایی که بعد از جراحی و کانول‌گذاری داخل بطن مغزی فقط کاپسازپین با دوز ۱۰ نانومول دریافت کردند. گروه کاپسایسین + کامپفرول، رت‌هایی که بعد از جراحی و کانول‌گذاری داخل بطن مغزی کاپسایسین با دوز ۵ نانومول و کامپفرول با دوز ۱/۵ میلی‌گرم به ازای هر رت دریافت کردند. گروه کاپسازپین + کامپفرول، رت‌هایی که بعد از جراحی و کانول‌گذاری داخل بطن مغزی کاپسازپین با دوز ۱۰ نانومول و کامپفرول 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 کتامین  $100 \text{ mg/kg}$  و زایلازین  $10 \text{ mg/kg}$  بیهوش شدند. پس از قرار دادن حیوان بیهوش در دستگاه استریوتاکس، یک پد گرما را برای حفظ درجه حرارت بدن رت در محدوده  $36.5 \pm 0.5$  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 کاملاً در ناحیه میانی قرار بگیرد، ثابت گردید. همچنین یک پنبه خیس روی چشمان رت قرار داده می‌شود 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 لامبدا 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. کانول‌گذاری در ناحیه بطن راست با مختصات  $AP = 0.8 \text{ mm}$ ,  $ML = 1.4 \text{ mm}$ ,  $DV = 3 \text{ mm}$  انجام شد و کانول راهنما توسط دستگاه استریوتاکس در داخل بطن راست مغز قرار گرفت. پیچ عینک ضدعقونی شده و کانول توسط سیمان (اکریل دندان پزشکی) ثابت شد. برای جلوگیری از بسته شدن مجرای کانول یک سوزن آغشته به پارافین داخل مجرای کانول قرار گرفت. بعد از

مقایسه زمان پرش‌دم 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 ( $P < 0.001$ ,  $F(5,24) = 11.68$ ). متعاقباً پس از آزمون توکی نشان داد که تزریق دوز ۱/۵ میلی‌گرم بر رت کامپفرول سبب کاهش درد در موش‌های صحرایی نسبت به گروه‌های کنترل و DMSO گردید. چنانچه مدت زمان عکس‌العمل پرش‌دم در موش‌های صحرایی (Tail-flick Latency) را از  $2.8 \pm 0.67$  ثانیه به  $0.9 \pm 0.79$  ثانیه رساند ( $P < 0.001$ ). این در حالی است که استفاده از دوزهای ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم کامپفرول در این تست اثر ضد دردی معناداری را در مقایسه با گروه‌های کنترل و DMSO نشان ندادند. همچنین این پس از آزمون نشان داد تزریق مورفین سبب کاهش معنادار درد در مقایسه با گروه‌های کنترل و DMSO می‌گردد چنانچه زمان عکس‌العمل پرش‌دم در رت‌ها را از  $2.8 \pm 0.59$  ثانیه در گروه کنترل به  $9.1 \pm 2.5$  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 ( $P = 0.0005$ ,  $F(5,24) = 6.21$ ). متعاقباً پس از آزمون توکی نشان داد که تزریق کاپسایسین به همراه دوز ۱/۵ میلی‌گرم بر رت کامپفرول سبب کاهش درد در موش‌های صحرایی نسبت به گروه‌های کنترل و DMSO گردید ( $P < 0.001$ ). چنانچه مدت زمان عکس‌العمل پرش‌دم در موش‌های صحرایی (Tail-flick Latency) را از  $2.7 \pm 0.47$  ثانیه به  $7.5 \pm 0.73$  ثانیه رساند. همچنین تزریق کاپسازپین 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 کپسازپین به همراه دوز ۱/۵ میلی‌گرم کامپفرول در این تست اثر ضد دردی معناداری را در مقایسه با گروه‌های کنترل و DMSO نشان نداد.



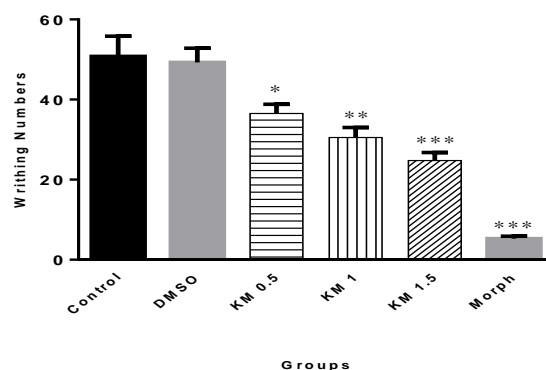
(ب)

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

## یافته‌ها

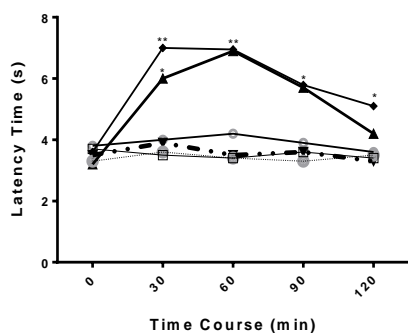
مقایسه تعداد انقباضات شکمی در بین گروه‌های مورد مطالعه؛ طبق تجزیه و تحلیل‌های به دست آمده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و با توجه به نمودار ۱- الف، نتایج نشان داد که بین گروه‌های آزمایشی تفاوت معناداری وجود دارد [ $F(9, 50) = 9.5$ ]. متعاقباً پس از آزمون توکی نشان داد که تزریق دوزهای ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر رت کامپفرول به ترتیب با  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  و  $P < 0.001$  سبب کاهش تعداد انقباضات شکمی موش‌های صحرایی نسبت به گروه‌های سالین و DMSO گردیدند. همچنین این پس از 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 [ $F(9, 50) = 4.8$ ]. متعاقباً پس از آزمون توکی نشان داد که تزریق کاپسایسین به تنهایی و نیز استفاده توأم کاپسایسین به همراه دوز بالای کامپفرول (۱/۵ میلی‌گرم بر رت) در مقایسه با گروه‌های سالین و DMSO تفاوت معناداری دارد به ترتیب با  $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ . همچنین این پس از آزمون نشان داد، تزریق توأم کاپسازپین به همراه دوز بالای کامپفرول (۱/۵ میلی‌گرم بر رت) در مقایسه با گروه‌های سالین و DMSO تفاوت معناداری دارد ( $P < 0.05$ ).

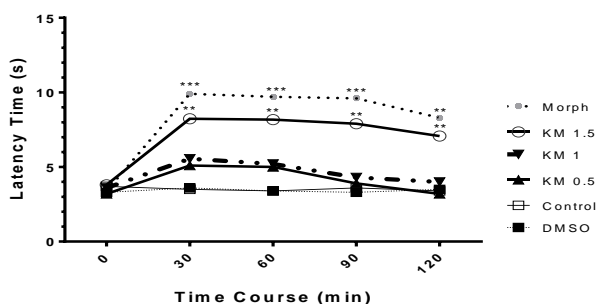


(الف)

**نمودار ۱:** الف: مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف کامپفرول با دوزهای ۰/۵ و ۱/۵ میلی‌گرم بر رت در تست درد انقباضات شکمی ناشی از اسید استیک. ب: مقایسه میانگین تعداد انقباضات شکمی ناشی از اسید استیک با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم بر رت به همراه شناسایی مکانیسم وانیلوئیدی. KM: کامپفرول. Morph: مورفین. CAP: کپسایسین، CPZ: کپسازپین،  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$  \*\*\* اختلاف معنادار با گروه کنترل. تعداد حیوانات آزمایشگاهی در هر گروه = ۶

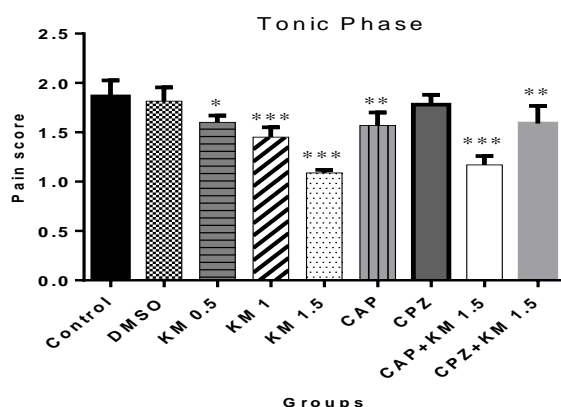


(ب)

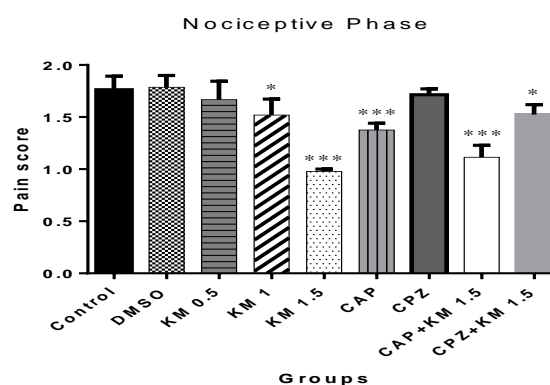


(الف)

**نمودار ۲:** الف: مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف کامپفرول با دوزهای ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر رت در تست درد تیل فلیک. ب: مقایسه میانگین عقب کشیدن دم رت بر با غلظت ۱/۵ میلی گرم کامپفرول به همراه شناسایی مکانیسم وانیلوئیدی در تست درد تیل فلیک. KM: کامپفرول، Morph: مورفین، CAP: کپسازپین، CPZ: کپسازپین.  $P < 0.05$ ،  $P < 0.01$ ،  $P < 0.001$  اختلاف معنادار با گروه‌های کنترل و DMSO. تعداد حیوانات آزمایشگاهی در هر گروه = ۶



(ب)



(الف)

**نمودار ۳:** الف: مقایسه میانگین نمره درد با غلظت‌های مختلف کامپفرول با دوزهای ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر رت و همچنین مقایسه میانگین نمره درد با غلظت ۱/۵ میلی گرم کامپفرول به همراه شناسایی مکانیسم وانیلوئیدی در آزمون درد با فرمالین در فاز Nociceptive (فاز ۱) ب: مقایسه میانگین نمره درد با غلظت‌های مختلف کامپفرول با دوزهای ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر رت و همچنین مقایسه میانگین نمره درد با غلظت ۱/۵ میلی گرم کامپفرول به همراه شناسایی مکانیسم وانیلوئیدی در آزمون درد با فرمالین در فاز Tonic (فاز ۲). KM: کامپفرول، CAP: کپسازپین، CPZ: کپسازپین.  $P < 0.05$ ،  $P < 0.01$ ،  $P < 0.001$  اختلاف معنادار با گروه کنترل. تعداد حیوانات آزمایشگاهی در هر گروه = ۶

کاهش امتیاز درد گردد. از سویی تزریق کپسازپین به صورت توأم با کامپفرول با دوز ۱/۵ میلی گرم توانست نسبت به گروه‌های کنترل و DMSO سبب کاهش امتیاز درد گردد ( $P < 0.05$ ).

طبق آنالیزهای به دست آمده از آزمون واریانس یک‌طرفه و با توجه به نمودار ۳-ب، در فاز دوم تست فرمالین، نتایج نشان داد که بین گروه‌های آزمایشی تفاوت معناداری وجود دارد ( $F(8,45) = 29.63$ ،  $P < 0.001$ ). متعاقباً پس از آزمون توکی نشان داد که در فاز دوم تست فرمالین، تزریق دوزهای ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر رت کامپفرول سبب کاهش درد در موش‌های صحرایی نسبت به گروه‌های کنترل و DMSO گردید (به ترتیب با:  $P < 0.05$ ،  $P < 0.001$  و 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 یک‌طرفه و با توجه به نمودار ۳-الف، نتایج نشان داد که بین گروه‌های آزمایشی تفاوت معناداری وجود دارد ( $F(8,45) = 38.51$ ،  $P < 0.001$ ).

متعاقباً پس از آزمون توکی نشان داد که در فاز اول تست فرمالین، تزریق دوزهای ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر رت کامپفرول سبب کاهش درد در موش‌های صحرایی نسبت به گروه‌های کنترل و DMSO گردید (به ترتیب با:  $P < 0.05$ ،  $P < 0.001$ ). همچنین در فاز اول تست فرمالین مشخص شد که تزریق کپسازپین به تنهایی با  $P < 0.001$  و تزریق کپسازپین به صورت توأم با کامپفرول با دوز ۱/۵ میلی گرم با  $P < 0.001$  توانست نسبت به گروه‌های کنترل و DMSO سبب

تزریق کپسایسین به تنهایی با  $P < 0.01$  و تزریق کپسایسین به صورت توأم با کامپفرول با دوز  $1/5$  میکروگرم با  $P < 0.001$  نتوانست نسبت به گروه‌های کنترل و DMSO سبب کاهش امتیاز درد گردد. از سویی تزریق کپسازپین به صورت توأم با کامپفرول با دوز  $1/5$  میلی گرم نتوانست نسبت به گروه‌های کنترل و DMSO سبب کاهش امتیاز درد گردد ( $P < 0.01$ ).

## بحث

در این مطالعه تجربی مشخص شد کامپفرول احتمالاً می‌تواند از طریق مسیر گیرنده های 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 کامپفرول 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 کامپفرول 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 گسترده و 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 کامپفرول 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، می‌توان گفت احتمالاً کامپفرول دارای اثرات ضد دردی مرکزی 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 کامپفرول پاسخ‌های ناشی از درد را به میزان قابل توجهی کاهش داد. شروع اثر کامپفرول 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 کامپفرول وابسته به زمان می‌باشد. کامپفرول در ترکیب با آگونیست گیرنده وانیلوئیدی اثر قابل توجهی در کنترل درد نسبت به گروه دریافت کننده‌ی کامپفرول و

کپسایسین به تنهایی نداشت. گروه دریافت کننده‌ی کپسازپین-کامپفرول به طور قابل توجهی با گروه کامپفرول تفاوت داشت و مانع ایجاد بی دردی توسط کامپفرول شد و تأخیر در کشش دم را به ۴ ثانیه کاهش داد. اثر کنترلی مورفین بلافاصله 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 گسترده به منظور ارزیابی فعالیت ضد دردی محیطی استفاده می‌شود [۱۷]. تزریق کامپفرول سبب کاهش معنادار تعداد انقباضات شکمی گردید. بنابراین می‌توان این گونه استنباط کرد که اثر ضد دردی کامپفرول احتمالاً از طریق مکانیسم‌های محیطی حمایت می‌گردد. کامپفرول 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 کامپفرول 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 توأم کپسازپین و کامپفرول به میزان قابل توجهی با گروه کامپفرول تفاوت داشت. به این معنا که کپسازپین توانایی بلوک گیرنده کامپفرول را دارد که مانع اثر ضد دردی کامپفرول شده، اما مکانیسم دخیل در ایجاد این بلوک مشخص نیست؛ اما تزریق کپسایسین به عنوان پیش دارو قبل از تزریق کامپفرول 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 ضددردی استفاده می‌شود [۲۰]. تزریق زیرجلدی فرمالین رقیق شده به کف پای موش صحرایی سبب ایجاد رفتارهای القا شده به واسطه درد چون: لیسیدن، جویدن، بلند کردن پای عقبی می‌گردد. عموماً این رفتارهای ناشی از درد در طی دو فاز بعد از تزریق فرمالین مشاهده می‌شوند. فاز اول بلافاصله بعد از تزریق فرمالین ظاهر می‌شود و پس از گذشت 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



و ایجاد بی دردی می‌شود [۲۵]. گزارش شده است که فعال شدن گیرنده‌های  $G_q$ -پروتئین (GqPCRs)، از جمله گیرنده‌های mGlu گروه I، با فعال کردن PLC، دی آسیل گلیسرول (DAG) تولید می‌کنند. مطالعات دیگر جهت بررسی نقش احتمالی گیرنده‌های 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 محرک‌های دردناک و آزاد سازی گلوتمات در PAG در در موش صحرایی می‌شود، اثری که توسط آنتاگونیست‌های گیرنده گلوتمات (mGlu) متوقف می‌شود [۲۶]. همچنین طبق مطالعه Liao در سال ۲۰۱۲ فعال سازی گیرنده‌های TRPV1 توسط کپسایسین به وسیله افزایش DAG از طریق فعالسازی مسیر PLC منجر به آزاد سازی گلوتمات از پایانه‌های گلوتماترژیک می‌شود که این نتیجه به دلیل مسیر فعالیت مشترک این دو گیرنده می‌باشد و نهایتاً این وقایع باعث فعال شدن مسیر نزولی کنترل درد می‌شوند [۲۷].

Marzo در سال ۲۰۰۹ گزارش کرد که آگونیست گیرنده‌های TRPV1، کپسایسین (3 nmol/rat) و آگونیست گیرنده‌ی انکفالین [D-Ala(2), NMe-Phe(4), Gly(5)-ol] (6 pmol/rat)، زمانی که به صورت همزمان در PAG شکمی (جانبی تزریق شد، باعث ایجاد: ۱) اثرات ضد دردی در آزمون درد حرارتی؛ ۲) تحریک انتشار گلوتمات به (rostral RVM ventromedial medulla؛ ۳) مهار فعالیت نورون سلول‌های روشن در RVM (۴) افزایش فعالیت سلول‌های روشن در RVM که همه این اثرات توسط آنتاگونیست گیرنده‌های TRPV1 و اپیوئیدی ۵-iodo-رزینیفراتوکسین و نالوکسان، به ترتیب بلوک شدند [۲۸]. بنابراین گیرنده وانیلوئیدی نوع یک از طریق تعامل با اپیوئیدها و گلوتمات می‌تواند اثر مهاری بر درد داشته باشد. اما طبق نتایج مطالعه حاضر ترکیب آگونیست گیرنده‌ی وانیلوئیدی نوع یک با کامپفرول اثر مهاری تقویتی بر روی درد نداشتند. نتایج تحقیق حاضر توانایی کامپفرول در کنترل درد را تأیید می‌کند. همچنین مطالعات نشان می‌دهد که تزریق مرکزی کامپفرول با سیستم درون زاد کنترل درد تعامل دارد که نشان دهنده‌ی فعالیت مرکزی کامپفرول است و این نتیجه با گزارش‌های ارائه شده در مطالعات قبلی مرتبط با فلاونوئیدهای مشابه مطابقت دارد [۲۹-۳۲].

### نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، اثر ترکیب کامپفرول با آگونیست و آنتاگونیست گیرنده‌های TRPV1 و تعامل کامپفرول داخل بطن مغزی با گیرنده‌های TRPV1 را بررسی کردیم. هر دو گیرنده‌ی وانیلوئیدی نوع یک و کامپفرول از طریق افزایش فسفولیپاز c فعال می‌شوند. همچنین آنتاگونیست گیرنده‌های

دردزای نخاعی ایجاد شود [۲۱]. در فاز دوم مدیاتورهای مختلفی تولید و آزاد می‌شوند و سبب برانگیخته شدن پاسخ‌های التهابی شده و همبستگی زیادی با افزایش تولید پروستاگلاندین‌ها و القاء سیکلواکسیژنازها دارد. نتایج حاصل از تست فرمالین نشان از اثر ضددردی کامپفرول دارد که بر اساس این نتایج می‌توان 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 می‌شود از طریق تحریک مسیرهای نزولی ضد درد سبب کاهش درد می‌شود [۲۲]. گروه کپسازپین- کامپفرول نسبت به گروه کامپفرول تفاوت معناداری داشت و اثر ضددردی کامپفرول مهار شد. شواهد موجود از جمله مطالعه حاضر، نشان می‌دهد که گیرنده‌ی TRPV1 و کامپفرول می‌توانند در میان عوامل ضد درد قرار بگیرد. گیرنده‌ی TRPV1 با اتصال به پروتئین  $G_q$  (یک زیر واحد پروتئین G است) فسفولیپاز C را فعال می‌کند که این آنزیم با هیدرولیز  $PIP_2$ ، DAG و  $IP_3$  را تشکیل می‌دهد. DAG در ادامه توسط دی آسیل گلیسرول لیپاز (DAGL) به ۲-آراشیدونیل گلیسرول (2-AG) تبدیل و 2-AG تحت یک فرآیند خود به خودی با جابه جایی گروه آسیل به ۱-آراشیدونیل گلیسرول (1-AG) تبدیل می‌شود. هم 2-AG و هم 1-AG هر TRPV1 را فعال می‌کنند. فعالیت این دو توسط آنزیم‌های مونو آسیل گلیسرول لیپاز (MAGL) و آلفا/بتا هیدرولاز دومین (ABHD 6,12) خاتمه می‌یابد. فعالیت TRPV1 به طور غیر مستقیم توسط PKC نیز تنظیم می‌شود (وابسته به فسفریله شدن کانال یونی). همچنین تولید  $IP_3$  باعث آزاد شدن کلسیم از میتوکندری و شبکه اندوپلاسمی و فعال شدن کلسیم کالمودولین وابسته به پروتئین کیناز-۲ می‌شود. طبق تحقیقات Zygmunt مهار MAGL در مغز منجر به کاهش درد می‌شود [۲۳]. به کاربردن سیستمیک JZL184 (بلوک کننده‌ی آنزیم مونو آسیل گلیسرول لیپاز) باعث افزایش سطح 2-AG در مغز می‌شود [۲۲]. همچنین با تزریق داخل مغزی فعال کننده‌های گیرنده‌های TRPV1 بی دردی ایجاد می‌شود. مطابق با نتایج مطالعه‌ی حاضر می‌باشد [۲۴]. با تزریق داخل بطن مغزی JZL184 با دوز 10، ۱۰۰ nmol دقیقاً 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 کپسازپین به همراه JZL184 از بین می‌رود همچنین تزریق JZL184 در موش‌هایی که به صورت ژنتیکی فاقد گیرنده‌های TRPV1 بودند باعث کاهش درد نشد [۲۲]. JZL184 به عنوان یک مهار کننده‌ی قوی و انتخابی برای MAGL سطوح 2-AG و 1-AG را افزایش می‌دهد و باعث افزایش فعالیت گیرنده‌های TRPV1

دانشگاه علوم پزشکی همدان سپاسگزاری می‌نمایند.

### تضاد منافع

این مطالعه برای نویسندگان هیچگونه تضاد منافع 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 نویسندگان

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

TRPV1 توانست اثر ضد درد کامپفرول را بلوک کند و این احتمال وجود دارد که اثر ضد درد کامپفرول توسط مسیر وانیلوئیدی حمایت و تنظیم می‌شود. طبق نتایج نشان داده شد که کامپفرول می‌تواند اثر ضد درد وابسته به زمان را در موش القا کند. طبق نتایج ما گیرنده کامپفرول 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 کپسایسین و کامپفرول را در سیستم عصبی مرکزی هدف قرار می‌دهد در کاهش هیپرآلژزی‌های حرارتی و شیمیایی بی اثر است؛ اما با تأثیر آنتاگونیست این گیرنده بر عملکرد کامپفرول نشان داده شد که مسیر وانیلوئید در ایجاد اثر ضد درد کامپفرول 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. نویسندگان این مقاله از تمامی افراد دخیل در مرکز تحقیقات فیزیولوژی اعصاب و گروه فیزیولوژی

- 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.
- McGaraughy 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.



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-Chloroethanamide (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.