Physiology and Pharmacology, 14(3), 281-292
Autumn 2010 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Effect of aqueous extract of *Drosera spatulata* on firing rate of paragigantocellularis nucleus neurons after pain induction by formalin in rats

Sahar Golabi[1], Majid Hassanpour-Ezzati[2*], Kambiz Rohampour[3]

1. Dept. physiology, School of medicine, Hormozgan medical sciences university, Bandar Abbas, Iran
2. Dept. Biology, School of basic sciences, Shahed university, Tehran, Iran
3. Dept. physiology, School of medical sciences, Tarbiat modarres university, Tehran, Iran

Received: 2 May 2010 **Accepted: 4 July 2010**

Abstract

Introduction: We have previously demonstrated that i.p. injection of aqueous extract of the aerial parts of *Drosera spatulata* (*Droseraceae*) can induce remarkable analgesia in both phases of formalin test in rats. Analgesia induced in acute phase of formalin test is mainly mediated by the activation of central analgesic mechanisms. Since paragigantocellularis (PGi) nucleus activation, as a part of the brain descending pain control systems causes analgesian. Therefore, we studied the role of this nucleus in analgesic action of the extract in acute pain. This was performed by the assessment of the effects of the extract treatment on PGi neural activity that was augmented by injection of formalin to contralateral hind paw of anesthetized rats.

Methods: Twenty urethane anesthetized (1.2- 1.5 g/kg, i.p.) male rats were divided into control, *D. Spatulata* extract (0.05 mg/kg, i.p.) and sodium salicylate (300 mg/kg, i.p.) treated groups. Firing rate of PGi neurons were recorded by extracellular single unit recording technique. Formalin (50µl, 2%, s.c.) was injected to the plantar surface of the hind paw of rats 30 min after each of the above treatments. Alterations in the response of the opposite PGi neurons were recorded. Data was analyzed by Wilcoxon ranking test.

Results: In rats that received extract injections, the firing rate was increased in 66.6% of PGi neurons, while it was decreased in 16.6% of neurons ($p<0.001$). The extract had no effect on 16.6% of neurons in formalin injected rats. While, sodium salicylate treatment significantly decreased the firing rate in 50% of PGi neurons in formalin pretreated rats ($p<0.001$).

Conclusion: The relation between PGi neuronal augmentation and analgesia was previously reported. Thus, the augmentation of firing rates in a high percentage of PGi neurons after the extract injection provides evidence about the role of PGi nucleus in reduction of pain in the acute phase of the formalin test.

Key words: Aqueous extract of *Drosera Spatulata*, Formalin induced pain, Paragigantocellularis nucleus, Single unit recording, Rat

*Corresponding author e-mail: Hassanpm@yahoo.com
Available online at: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۴ (۳)، ۲۸۱ – ۲۸۷
پاییز ۱۳۸۹

فیزیولوژی و فارماکولوژی

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

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

دریافت: ۱۲ اردیبهشت ۸۹ پذیرش: ۱۳ تیر ۸۹

چکیده

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

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

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

نتیجه‌گیری: عصاره این گیاه می تواند با افزایش تعداد نورون های با شلیک تشدیده شده در هسته PGi و افزایش خروجی این هسته در ایجاد بی دردی نقش داشته باشد. اما سدیم سالیسیلات نمی تواند از سد خون– مغز عبور کند.

واژه‌های کلیدی: عصاره آبی گیاه دروزرا اسپاتولاتا- هسته پاراژیگانتوسلولاریس– ثبت تک واحدی خارج سلولی– آزمون فرمالین– موش صحرایی

مقدمه

درد، یک پدیده چند بعدی متأثر از عوامل حسی، هیجانی و محیطی است. بنا به تعریف مؤسسه بین المللی درد "درد، یک حس ناخوشایند یا تجربه هیجانی مرتبط با ضایعه بافتی است"[۱۱]. بشر از دیر باز به روش های گوناگون به مبارزه با درد پرداخته و امروزه گیاهان دارویی و داروهای با منشأ گیاهی از مهم ترین داروهای کاهش دهنده درد محسوب می شوند

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: Hassanpm@yahoo.com
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

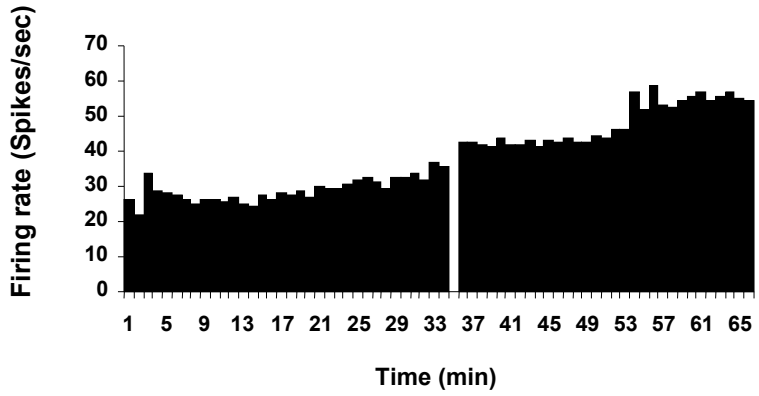
[۷]. گیاه دروزرا اسپاتولا (*Drosera spatulata*) یا شبنم خورشید از خانواده دروزراسه (Droseraceae) غیر بومی ایران است که در طب سنتی برای درمان مشکلاتی چون: درد استخوان، دردهای افزایش یابنده، مشکلات تنفسی، عوارض التهابی سرماخوردگی و سرفه‌های شدید مصرف می شده است [۱۲]. روش باز زایی گیاهی، تجربه مطالعه خواص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

با توجه به اینکه گزارش شده ترکیباتی که سبب کاهش درد در مرحله اول آزمون فرمالین می شوند، اثرات خود را بصورت مرکزی و از طریق مسیر نزولی کنترل درد اعمال می کنند [۴] و اینکه هسته PGi یکی از خروجی های مهم شبکه نزولی مهار درد است [۳۱ و۲۹]، این فرضیه مطرح می شود که آیا فعال شدن سیستم نزولی کنترل درد از طریق فعال کردن این هسته می تواند در اثر کاهش دهنده درد این عصاره نقشی داشته باشد یا نه؟ لذا، در این تحقیق با بکار گیری روش الکتروفیزیولوژیک ثبت تک واحدی خارج سلولی تأثیر تجویز داخل صفاقی عصاره این گیاه بر سرعت شلیک نورون های هستهٔ PGi القا شده توسط تجویز فرمالین به کف پای مخالف هسته، مورد بررسی قرار گرفت.

سدیم سالیسیلات داروی ضد التهابی غیر استروئیدی است که با مهار آنزیم سیکلواکسیژناز باعث کاهش درد می شود [۸] که بر اساس نتایج آزمون فرمالین، هیچ اثر کاهش دهنده مرکزی بر فرآیند درد حاد ندارد و لذا ما این دارو را در این آزمایش به عنوان یک داروی کاهش دهنده درد بدون اثرات مرکزی انتخاب کردیم [۲۲ و۴].

مواد و روشها

مطالعه بر روی ۲۰ سر موش صحرایی نر نژاد اسپراگ (Sprague) در محدوده وزنی ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم، تهیه شده از مؤسسه رازی انجام شد. حیوانات در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت تاریکی- ۱۲ ساعت روشنایی، دمای محیط (۱± ۲۲ C°) و با دسترسی آزادانه به آب و غذا در قفس های جداگانه در گروه های ۴ و ۸ تایی نگهداری شدند. بساط ثبت تک واحدی خارج سلولی شامل: قفس فارادی، استرئو میکروسکوپ جراحی، آمپلی‌فایر مدل DAM 80 ساخت WPI کشور آمریکا، اوسیلوسکوپ، کامپیوتر مجهز به نرم افزار Cooledit نسخه ۲ جهت ثبت، نرم افزار موج بیز نوشته شده در گروه فیزیولوژی دانشگاه تربیت مدرس، دستگاه الکترودپولر عمودی و میکروالکترود شیشه‌ایی بود. پیش از ثبت، موش ها با تزریق داخل صفاقی اورتان به غلظت ۱/۵-۱/۲ گرم/کیلو گرم به صورت داخل صفاقی بیهوش می شدند [۱۰] سپس به کمک جراحی استریوتاکسی و با توجه به مختصات هسته PGi (جلو- عقب: ۱۱/۹- ، طرفی: ۱/۶ ± و عمق: ۸/۶ میلی‌متر) بر اساس اطلس پاکسینوز [۲۵] حفره ای در سطح جمجمه برای ورود الکترود ثبت تعبیه می شد. الکترودهای شیشه ای ثبات به کمک میکروالکترود پولر به گونه ای کشیده می شدند که دارای امپدانسی در حدود ۱۰MΩ-۲ باشند. سپس این الکترودها با محلول استات سدیم ۰/۵ مولار بعلاوه ۲٪ ترکیب رنگی Pontamine Sky Blue (PSB) پر می شدند. این محلول امکان تزریق رنگ به صورت ایونتوفورتیک را در پایان ثبت برای انجام تأیید بافت شناسی فراهم می آورد .سیگنال های حاصل از فعالیت نورون های هسته PGi بوسیله میکروالکترود به آمپلی‌فایر منتقل و تا ۱۰۰۰ برابرتقویت شده و فرکانس های ۳۰۰ تا ۳ کیلوهرتز آن برای ثبت به کامپیوتر ارسال می‌شد. گروه های آزمایشی شامل: ۱- شاهد: این گروه شامل موش هایی بود که ابتدا به مدت ۱۵ دقیقه از نورون های هسته PGi آنها ثبت گرفته شده و سپس ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲ % به عنوان محرک درد زا به کف پای مخالف هسته مورد ثبت تزریق می شد .۲- گروه آزمون دریافت کننده عصاره آبی گیاه دروزرا: این گروه شامل موش هایی بود که پس از ۱۵دقیقه ثبت اولیه، با عصاره دروزرا به غلظت ۰/۰۵



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

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

۱۰۰ ×تعداد کل نورون ها /تعداد نورون های با تغییر مشابه در شلیک نورونی = درصد نورون هایی که شلیک آنها تغییر کرده است

یافته ها

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

بحث

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

جدول۱- میزان تغییر در شلیک نورونی نسبت به حالت پایه در نورون های هسته PGi بر حسب درصدی از تعداد کل نورون های مورد ثبت بدنبال هریک از دستکارهای خاص درهر کدام از گروه ها

گروه های آزمایشی	تغییر در سرعت شلیک نورونی (Firing rate) در مقایسه با شلیک پایه		
	درصد نورون های بدون تغییر در پاسخ	درصد نورون های با پاسخ کاهشی	درصد نورون های با پاسخ افزایشی
گروه کنترل (۸ نورون در ۸ سر موش)	۵۰٪	٪۳۷/۵ ***	۱۲/۵٪
گروه دریافت کننده داخل صفاقی دوز ۰/۰۵mg/kg عصاره آبی گیاه (۶ نورون در۶ سر موش)	۱۶/۶٪	۱۶/۶٪	۶۶/۶٪ ***
گروه دریافت کننده داخل صفاقی دوز ۳۰۰mg/kg سدیم سالیسیلات (۶ نورون در۶ سر موش)	۱۶/۶٪	۵۰٪	۱۶/۶٪

*** تفاوت معنی دار ($p<0/001$). نسبت به ثبت پایه

نورون های پاسخگو به درد، یعنی نورون هایی که شلیک آنها پس از هر یک از دستکاری ها دچار تغییرمی شود را ملاک قرار داده و آنها را در فعالیت سیستم نزولی کنترل درد از طریق هسته PGi در نظر گرفتیم. یافته ما از ثبت فعالیت نورون های هسته PGi در گروه کنترل نشان داد که بدنبال تجویز فرمالین۱۲/۶٪ از کل نورون ها افزایش میزان فعالیت و ۳۷/۵٪ از آنها کاهش در فعالیت را نسبت به حالت پایه نشان می دهند. اما پیش درمانی بصورت تجویز داخل صفاقی دوز مؤثر عصاره آبی گیاه دروزرا اسپاتولاتا سبب شد تا ۶۶/۶٪ از نورونهای مورد ثبت افزایش و ۱۶/۶٪ از آنها کاهش در میزان فعالیت پایه را نشان دهند. بدین ترتیب، هسته PGiحیوانی که عصاره را دریافت کرده است در مقایسه با حیوان کنترل دارای برونده تحریکی بیشتری بوده و لذا مهار نزولی بیشتری را بر سطح نخاع اعمال می کند. نتایج ثبت انجام شده از گروه دریافت کننده سدیم سالیسیلات (۳۰۰mg/kg, i.p.) در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی داری را نشان نمی دهد که دال بر عدم وجود اثر بی دردی مرکزی برای سدیم سالیسیلات از طریق هسته PGi است. با توجه به اینکه عصاره مورد آزمایش در این پژوهش از نوع آبی است این سؤال مطرح می شود که کدام دسته از مواد مؤثره این عصاره احتمالاً با عبور از سد خون- مغز توانسته اند عامل بروز این اثرات باشند؟ در این رابطه باید گفت که مطالعات قبلی نشان داده اند، فلاونوئیدها عمده ترین ترکیب موجود در عصاره آبی این گیاه هستند که جزء ترکیبات پلی فنولیک محسوب می شوند [۹]. فلاونوئیدها می توانند از سد خون- مغز عبور کنند [۲۴]. این فلاونوئید ها می توانند بواسطه مکانیسم های مختلفی از جمله اثر بر گیرنده های $GABA_A$ [۳۰و۲۱و۱۳و۶]، تأثیر بر گیرنده های اپیوئیدی [۲۶ و۱۹]، اثر بر گیرنده های آلفا دو- آدرنرژیک [۱۷] و مهار آنزیم های درگیر در التهاب در مغز [۱۳و۳]، درد را به صورت مرکزی کنترل کنند. در این ارتباط، مطالعات وجود گیرنده های $GABA_A$ را با توزیع گسترده در نواحی مختلف سیستم اعصاب [۳۲] از جمله، RVLM که هسته PGi به عنوان یکی از هسته های کنترل کننده مرکزی درد نیز جزئی از آن است نشان داده است [۱۵و۱۴]. حضور گیرنده های اپیوئیدی [۳۱] و گیرنده آلفا دو- آدرنرژیک [۱] نیز در این هسته گزارش شده است چون با تحریک گیرنده های $GABA_A$ [۳۲]، گیرنده های اپیوئیدی [۲۹و۲۸] و گیرنده های آلفا دو- آدرنرژیک [۱۸] منجر به بی دردی می شود. بعنوان یک نتیجه نهائی اینطور پیشنهاد می شود که عصاره آبی گیاه دروزرا اسپاتولاتا، حاوی ترکیبات مؤثره ای (احتمالا" فلاونوئیدها) است که حداقل بخشی از اثرات بی دردی مرکزی خود را با واسطه هسته PGi اعمال می کند.

سپاسگزاری

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

References

[1] Fathi Moghaddam H, Kesmati M, Mohammadpour Kargar H, The effect of clonidine administration into lateral paragigantocellularis on morphine withdrawal in morphine dependent male rats. ***J Rafsanjan Univ Med Sci*** 2 (1) 1381 52-60.

[2] Golabi S, Hassanpour-Ezatti M, Azhdari H, Rohampour K, Radjabian T, Ekhetraie Tousi S, Anti-nociceptive activity of regenerated Drosera spatulata aqueous extract by rat formalin test. ***J Med Plants*** 33 (2010) 35-40.

[3] Ahmadiani A, Fereidoni M, Semnanian S, Kamalinejad M, Saremi S, Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Sambucus ebulus rhizome extract in rat. ***J Ethnopharmacol*** 61(1998) 229-35.

[4] Ahmadiani A, Javan M, Semnanian S, Barat E, Kamalinejad M, Anti-inflammatory and antipyretic effects of Trigonella foenum-graecum leaves extract in the rat. ***J Ethnopharmacol*** 75 (2001) 283-6.

[5] Azami J, Llewlyn MB, Roberts MHT, The contribution of nucleus reticularisparagigantocellularis and nucleus raphe magnus to the analgesia produced by systemically administered morphine, investigated with the microinjection technique. Pain 12 (1982) 229-246. Cited in: Taguchi K, Kato M, Kikuta J, Abe K, Chikuma T, Utsunomiya I, Miyatake T, The effects of morphine-induced increases in extracellular acetylcholine levels in the rostral ventrolateral medulla of rat. ***J Pharmacol Exp Ther*** 289 (1999) 1539–1544.

[6] Belinda JH, Chebib M, Hanrahan RJ, Johnston RAG, (our suggestion: Hall BJ, Chebib M, Hanrahan JR, Johnston GA) Flumazenil-independent positive modulation of γ-aminobutyric acid action by 6-methylflavone at human recombinant α1β2γ2L and α1β2GABAA receptors. ***Eur J Pharmacol*** 491 (2004) 1-8.

[7] Calixto JB, Scheidt C, Otuki M, Santos AR, Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. ***Expert Opin Emerg Drugs*** 6 (2001) 261-79.

[8] Cashman J, Mcanulty G, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in perisurgical pain Management: mechanisms of action and rationale for optimum use. ***Drugs*** 49 (1995) 51-70.

[9] Cook NC, Samman S, Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources ***J Nutr Biochem*** 7 (1996) 66-76.

[10] Carev M, Valic M, Pecotic R, Karanovic N, Valic Z, Pavlinac I, Dogas Z, Propofol abolished the phrenic long-term facilitation in rats. ***Respir Physiol Neurobiol*** 170 (2010) 83-90.

[11] Cross SA, Pathophysiology of pain. ***Mayo Clin Proc*** 69 (1981) (our suggestion: 1994) 375-383.

[12] Duke JA, Handbook of medicinal herbs. Florida: CRC Press Inc, 1989, p:257.

[13] Fernández PS, Wasowski C, Loscalzo ML, Granger ER, Johnston ARG, Paladini CA, Marder M, Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. ***Eur J Pharmacol*** 539 (2006) 168–76.

[14] Fields HL, Basbaum AI, Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: Wall PD, Melzack R, editors, Textbook of Pain. London: Churchill Livingstone, 1999.

[15] Foley MC, Stantona JJ, Pricea ME, Cunningham TJ, Hassera ME, Heescha MC, GABAA 1 and 2 receptor subunit expression in rostral ventrolateral medulla in nonpregnant and pregnant rats. ***Brain Res*** 975 (2003) 196-206.

[16] Kanda T, Ohta Y, Kida A, Kemmotsu O, The effect of alpha2-adrenergic drugs on the activity of neurons in the rat nucleus raphe magnus in vitro. ***Anesth. Analg***. 88(1999) 459-61.

[17] Kweon YK, Soo JC, Hyuk JJ, Dong CZ, Pawan KSh, Shankar PP, et al. Epigallocatechin gallate inhibits the pacemaker activity of interstitial cells of cajal of mouse small intestine. ***Korean J Physiol Pharmacol*** 2008; 12:111-115.

[18] Lebars D, Gozariu M, Cadden SW, Animal models of nociception. ***Pharmacol Rev*** (2001) 597–652. 53

[19] Loscalzo ML, Wasowski C, Paladini CA, Marder M, Opioid receptors are involved in the sedative and antinociceptive effects of hesperidin as well as in its potentiation with benzodiazepines. ***Eur J Pharmacol*** 77 (2007) 399-404.

[20] Marczak L, Kawiak A, Lojkowska E, Stobiecki M, Secondary metabolites in in vitro ultured plants of the genus Drosera. ***Phytochemical Anal*** 16 (2005) 143-9.

[21] Medina JH, Viola H, Wolfman C, Marder M, Wasowski C, Calvo D, Paladini AC, Flavonoids: a new family of benzodiazepine receptor ligands. ***J Comp Neurol*** 22 (2004) 419-25.

[22] Naik VR, Agshikar NV, Abraham GJ, Analgesic and anti-inflammatory activity in alcoholic extracts of Cucumis trigonus Roxburghii. A preliminary communication. ***Pharmacol*** 20(1980) 52-60.

[23] Packer L, Midori H, Antioxidant food supplements in human health. San Diego: Academic press, 1999.

[24] Paper DH, Karall E, Kremser M, Krenn L, Comparison of the anti-inflammatory effects of Drosera rotundifolia and Drosera madagascariensis in the HET-CAM assay. ***Phytotherapy Res*** 19 (2005) 323-6.

[25] Paxinos G, Watson C, The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. San Diego: Academic Press. 1998

[26] Peter L, Katavic KL, Hernan N, Thomas EP, Flavonoids as opioid receptor ligands: identification and preliminary structure– activity relationships. ***J Nat Prod*** 70(2007) 1278–82.

[27] Saad B, Azaizeh H, Said o, Tradition and perspectives of arab herbal medicine: a review. ***Evid- Base Compl Alt 4 (2005) 475-479***

[28] Taguchi K, Kato M, Kikuta J, Abe K, Chikuma T, Utsunomiya I, Miyatake T, The effects of morphine-induced increases in extracellular acetylcholine levels in the rostral ventrolateral medulla of rat. ***J Pharmacol Exp Ther*** 289 (1999) 1539–1544.

[29] Takagi H, The nucleus reticularis paragigantocellularis as a site of analgesic action morphine and enkephalin. ***Trends Pharmacol Sci*** 1 (1980) 182-4.

[30] Williams JR, Spencer EPJ, Rice-Evans C, Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? ***Free Radic Biol Med*** 36 (2004) 838-49.

[31] Willis WD, Westlund KN, Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. ***J Clin Neurophysiol*** 14 (1997) 2-31.

[32] Young, Anne B, Chu, Dorothy CM, Distribution of GABA A and GABA B receptors in mammalian brain: Potential targets for drug development. ***Drug Dev Res*** 21 (1990) 161-7.