

ارزیابی اثرات ضد درد اوژنول استفاده از تست فرمالین در موش صحرائی

دکتر اسداله ظریف کار* - حسین اسکندریان** - مختار مختاری*** - جعفر آی****
*استادیار گروه آموزشی فیزیولوژی، دانشکده دندانپزشکی، علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی شیراز
**کارشناس ارشد فیزیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی کازرون، بخش زیست شناسی
*** استادیار فیزیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی کازرون، بخش زیست شناسی
**** استادیار گروه آموزشی آناتومی، دانشکده علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی فسا

Title: An evaluation on antinociceptive effects of eugenol by formalin test in rats

Authors: Zarifkar A. Assistant Professor,* Skandaryan HMS,** Mokhtary M. Assistant Professor,*** Ay J. Assistant Professor****

Address: Dept. of Physiology, Faculty of Dentistry, Shiraz University of Medical Sciences

** Dept. of Physiology, Kazeroon Azad University

***Dept. of Physiology, Kazeroon Azad University

****Dept. of Anatomy, Fasa University of Medical Sciences

Statement of Problem: Eugenol is the most important chemical compound of the clove tree (*Eugenia Caryophyllata*) extract. That is widely used in dentistry as a bactericidal and pain relieving agent.

Aim: The aim of the current study was to evaluate the antinociceptive effect of local and systemic administration of eugenol by formalin test in rats.

Materials and Methods: In this research, 56 male Wistar rats, weighing 230 ± 20 g were divided into seven groups ($n=8$). Ten minutes before formalin test, different doses of eugenol (12.5, 25, 50 mg /in groups 2, 3, 4 respectively) were injected to the right hind paw of the rats subcutaneously. In- group 5 eugenol (50 mg) was injected to the contralateral hind paw. In group 6 eugenol (100 mg/ kg) and control group (group 7), equal volume of normal saline was injected intraperitoneally. The minutes 0-5 and 16-60 were considered as acute and chronic phases of pain in the formalin test, respectively. Data were statistically analyzed by ANOVA and Tukey's tests.

Results: The results showed that local injection of eugenol to the same paw receiving formalin caused a decrease of nociception in both acute and chronic phases of formalin test ($P < 0.005$). However, in the group that eugenol (50mg/ kg) was injected to the contralateral paw, no significant differences were observed in the pain score in comparison with the control group. Intraperitoneal injection of eugenol (100mg/kg) did not reduce the nociception in the acute phase, but it caused a significant decrease of nociception in tonic phase ($P < 0.001$).

Conclusion: It was concluded that eugenol, as a local anesthetic drug not only inhibits nociceptive impulse conduction on the peripheral pain fibers, but also centrally reduce chronic pain.

Key words: Eugenol- Pain- Antinociception- Formalin test- Rat

Journal of Dentistry. Tehran University of Medical Sciences (Vol. 16; No.1; 2003)

چکیده

بیان مسأله: اوژنول (Eugenol) مهمترین ماده تشکیل‌دهنده عصاره درخت میخک (*Eugenia Caryophyllata*) است که در دندانپزشکی از آن به‌عنوان ضدعفونی‌کننده و آرام‌کننده درد دندان استفاده می‌شود.

هدف: مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثرات ضد درد اوژنول با تزریق موضعی و سیستمیک، با استفاده از تست فرمالین انجام شد.

روش بررسی: آزمایشات بر روی ۵۶ موش صحرایی نر از نژاد ویستار با وزن 20 ± 230 گرم در هفت گروه (در هر گروه ۸ نمونه) انجام شد. ده دقیقه قبل از شروع تست فرمالین، مقادیر مختلف اوژنول (۵۰، ۲۵، ۱۲/۵۰) به ترتیب در گروه‌های ۲، ۳ و ۴ و در گروه شاهد (گروه ۱) حجمی برابر سرم فیزیولوژی به‌صورت زیرجلدی به کف پای راست و در گروه ۵ اوژنول (۵۰ میلی‌گرم) به پای مخالف تزریق شد. در گروه ۶ اوژنول به مقدار ۱۰۰ mg/kg و در گروه ۷ (شاهد ۶) همان حجم سرم فیزیولوژی به صورت داخل صفاقی تزریق شد. دقایق ۵-۶۰ و ۶۰-۱۶ به ترتیب به‌عنوان مراحل حاد و مزمن درد در نظر گرفته شدند. برای مقایسه گروهها از آنالیز آماری ANOVA و آزمون Tukey's استفاده گردید.

یافته‌ها: تزریق موضعی اوژنول به کف همان پای که فرمالین تزریق شد، به‌صورت وابسته به دوز موجب کاهش معنی‌دار درد در هر دو مرحله حاد و مزمن تست فرمالین گردید ($P < 0/01$)؛ در گروهی که اوژنول به پای مخالف تزریق شد (۵۰ mg/rat) در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری در نمره درد مشاهده نشد. تزریق داخل صفاقی اوژنول (۱۰۰ mg/kg) تأثیری بر میانگین نمره درد در مرحله حاد نداشت اما به‌طور معنی‌داری موجب کاهش درد در مرحله مزمن درد گردید ($P < 0/001$).

نتیجه‌گیری: به‌نظر می‌رسد اوژنول علاوه بر این که همانند بی‌حس‌کننده‌های موضعی موجب مهار هدایت پیامها از گیرنده‌های حس درد به‌طور محیطی می‌شود، با مهار التهاب و تأثیر بر مسیر درد به‌طور مرکزی موجب تسکین درد مزمن نیز می‌گردد.

کلید واژه‌ها: اوژنول - درد - ضد درد - تست فرمالین

مجله دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران (دوره ۱۶، شماره ۱، سال ۱۳۸۲)

مقدمه

و تری‌کائین می‌باشد (۴،۳). در مورد اثرات ضد درد اوژنول، گزارشات پراکنده‌ای ارائه شده و تاکنون تحقیق منسجمی در این زمینه صورت نگرفته است (۵،۲،۱). براساس گزارشات برخی از محققین تأثیر اوژنول بر کاهش درد دندان، احتمالاً از طریق مهار متابولیسم آراشیدونیک اسید و مهار آزادسازی هیستامین و در نتیجه مهار التهاب صورت می‌گیرد (۹،۸،۷،۶)؛ از سوی دیگر برخی محققین گزارش کرده‌اند که اوژنول و سایر ترکیبات شبه کاپسایسین دارای جایگاه عمل مشترک می‌باشند و

اوژنول (Eugenol) از دسته داروهای فنلی و ماده اصلی تشکیل‌دهنده اسانس درخت میخک (*Eugenia Caryophyllata*) است. از این ماده به‌طور گسترده، به‌عنوان ضدعفونی‌کننده، ضد التهاب و آرام‌کننده موضعی درد دندان در عمل پانسمان و پرکردن دندان استفاده می‌شود (۲،۱). تحقیقاتی چند در مورد اثرات بی‌حس‌کنندگی اوژنول و مشتقات آن صورت گرفته است که نشان می‌دهد این اثرات در مواردی قابل مقایسه با سایر بی‌حس‌کننده‌های موضعی از جمله لیدوکائین

در گروه ششم، اوژنول با دوز 100mg/kg به صورت داخل صفاقی تزریق گردید.

در گروه هفتم (شاهد گروه شش) حجمی معادل حجم اوژنول تزریقی به گروه شش، از سرم فیزیولوژی به صورت داخل صفاقی تزریق گردید.

تزریق اوژنول یا سرم فیزیولوژی ۱۰ دقیقه قبل از تزریق فرمالین ۲/۵٪ (شروع تست فرمالین) انجام شد. تزریقات زیرجلدی به وسیله سرنگ هامیلتون و سرسوزن شماره ۲۶ به کف پای حیوان صورت گرفت.

تزریق و ثبت پاسخهای رفتاری حیوان به صورت دوسویه کور (Double Blind) انجام گرفت. حدود ۳۰ دقیقه قبل از شروع تست فرمالین، حیوانات به محل آزمایش آورده شدند تا با محیط تطابق پیدا کنند. ده دقیقه بعد از تزریق دارو یا سرم فیزیولوژی، فرمالین ۲/۵٪ به کف پای راست حیوان تزریق گردید و بلافاصله در محفظه آزمایش، از جنس پلکسی گلاس با ابعاد $30 \times 30 \times 30$ قرار داده شد. پاسخ رفتاری درد به کمک آینه‌ای که با زاویه ۴۵ درجه نسبت به سطح افق در زیر محفظه تعبیه شده بود، مشاهده و هر ۱۵ ثانیه، پاسخ حرکتی درد به صورت اعداد صفر، ۱، ۲ و ۳ (مطابق روش Dennis و Dubuisson) به شرح زیر ثبت گردید (۱۲، ۱۳):

عدد صفر، برای موقعی که حیوان در راه رفتن تعادل کامل داشت و وزنش روی هر دو پا توزیع شده بود.

عدد ۱، برای هنگامی که حیوان وزن بدن خود را روی پای تزریق شده، تحمل نمی‌کرد و یا در موقع راه رفتن مشکل داشت.

عدد ۲، برای وقتی که حیوان پنجه دردناک را بلند می‌کرد و هیچ‌گونه تماسی با کف محفظه نداشت.

عدد ۳، برای زمانی که حیوان پنجه دردناک را می‌لیسید یا به شدت تکان می‌داد.

نمره درد (Pain Score) در طی ۶۰ دقیقه به صورت ۱۲

رستپورهای آنها بر روی انتهای آکسون فیبرهای اوران اولیه در شاخ خلفی نخاع قرار دارند و ممکن است اثرات ضد درد اوژنول از طریق این گیرنده‌ها اعمال گردد (۵، ۱۰). با توجه به این که مشتقات اوژنول بر گیرنده‌های آدرنژیک اثرات مسدودکنندگی و یا آگونیستی دارند و این گیرنده‌ها نقش مهمی در سیستم بی‌دردی ایفا می‌کنند، به نظر می‌رسد که اوژنول علاوه بر مهار محیطی فیبرهای اوران درد، به طور مرکزی در نخاع و یا مراکز بالاتر موجب افزایش فعالیت سیستم بی‌دردی می‌گردد (۱۱)؛ به همین منظور در تحقیق حاضر اثر دوزهای مختلف اوژنول به صورت تزریق موضعی و نیز سیستمیک بر پاسخ درد، مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی

در این تحقیق که در آزمایشگاه تحقیقاتی بخش فیزیولوژی دانشکده پزشکی شیراز انجام شد، تعداد ۵۶ رأس موش صحرایی نر از نژاد ویستار با وزن 20 ± 230 گرم مورد استفاده قرار گرفت. از حیوانات در قفس‌های استاندارد و در شرایط آزمایشگاهی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتیگراد و دسترسی آزادانه به غذا و آب کافی نگهداری شد.

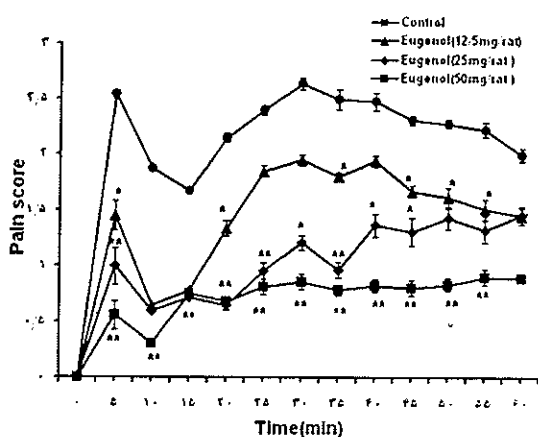
حیوانات به هفت گروه (هشت‌تایی) تقسیم شدند.

در گروه اول (گروه شاهد)، ۵۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی به صورت زیرجلدی به کف پای راست حیوان تزریق گردید.

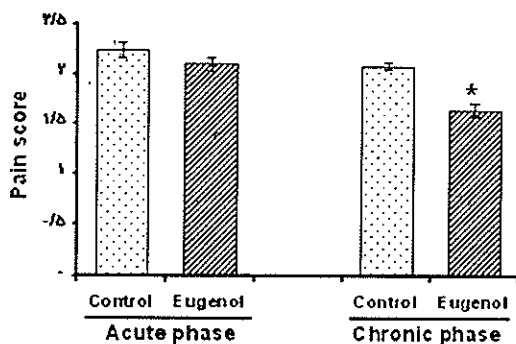
در گروه‌های دوم، سوم و چهارم، به ترتیب مقادیر ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم اوژنول (تهیه شده از شرکت Kemdent سوئیس) به صورت زیرجلدی به کف پای راست حیوان تزریق شد.

در گروه پنجم، ۵۰ میلی‌گرم اوژنول به کف پای چپ حیوان تزریق شد.

شد ($P < 0.001$). در گروهی که اوژنول به میزان ۵۰ میلی‌گرم به پای مخالف (پای چپ) تزریق گردید، اختلاف معنی‌داری بین نمره درد در هر دو مرحله حاد و مزمن تست فرمالین در مقایسه با گروه شاهد مشاهده نشد. میانگین نمره درد در گروه دریافت‌کننده اوژنول به صورت تزریق داخل صفاقی، در مرحله حاد با گروه شاهد (گروه هفتم) تفاوت معنی‌داری نشان نداد (تصویر ۲)؛ درحالی‌که نمره درد در مرحله مزمن تست فرمالین به طور معنی‌داری کاهش یافت (1.64 ± 0.07 در مقابل 2.08 ± 0.04 ; $P < 0.001$). در طول آزمایشات با دوزهای مورد استفاده، هیچ‌گونه حالت بیهوشی، اختلال حرکتی و یا نارسایی تنفسی در حیوانات مشاهده نگردید.



تصویر ۱- مقایسه میانگین نمره درد در گروههای دریافت‌کننده مقادیر مختلف اوژنول (تزریق زیرجلدی) با گروه شاهد در طول زمان مراحل تست فرمالین ($*P < 0.01$; $**P < 0.001$)



تصویر ۲- مقایسه میانگین نمره درد در مراحل حاد و مزمن تست فرمالین بین گروه دریافت‌کننده اوژنول (داخل صفاقی) با گروه شاهد ($*P < 0.001$)

بلوک ۵ دقیقه‌ای محاسبه گردید. میانگین نمره درد در هر بلوک طبق فرمول زیر محاسبه شد (۱۳، ۱۲).

$$\text{میانگین نمره درد} = \frac{0T_0 + 1T_1 + 2T_2 + 3T_3}{20}$$

که در آن T_0, T_1, T_2, T_3 تعداد ۱۵ ثانیه‌هایی است که حیوان در یک دوره ۵ دقیقه‌ای به ترتیب رفتارهای صفر، ۱، ۲ و ۳ را نشان می‌داد. در همه گروهها زمان صفر تا ۵ دقیقه به عنوان مرحله حاد درد و زمان ۱۶ تا ۶۰ دقیقه به عنوان مرحله مزمن در نظر گرفته شد. هر حیوان فقط یک بار مورد تست فرمالین قرار می‌گرفت و بعد از آزمایش از بین می‌رفت. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها در گروههای ۱ تا ۵ (تزریق زیر جلدی) از آزمون ANOVA و به دنبال آن برای بررسی اختلاف معنی‌دار بین گروهها از آزمون Tukey استفاده گردید (تصویرهای ۱ و ۲، جدول ۱). جهت مقایسه گروههای ششم و هفتم (تزریق داخل صفاقی) از آزمون t-student استفاده شد.

یافته‌ها

تصویر ۱ نشان‌دهنده اثر تزریق زیرجلدی مقادیر مختلف اوژنول (۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ mg/rat) بر پاسخهای رفتاری درد در موشهای صحرائی در طول ۶۰ دقیقه تست فرمالین می‌باشد. همانطور که ملاحظه می‌گردد، هر سه دوز اوژنول در تمام طول زمان تست فرمالین موجب کاهش معنی‌دار در میانگین نمره درد در مقایسه با گروه شاهد شده است ($P < 0.01$). این کاهش به وسیله دوز ۵۰ mg/rat بیشتر از دو دوز دیگر بود ($P < 0.001$). در جدول ۱ میانگین نمره درد در دو مرحله حاد و مزمن تست فرمالین در گروههای دریافت‌کننده مقادیر مختلف اوژنول با گروه شاهد مقایسه شده است. دوزهای ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ mg/rat اوژنول به ترتیب موجب کاهش میانگین نمره درد به میزان ۲۴٪، ۵۵٪ و ۷۱٪

طولانی شدن زمان Tail Flicking به میزان ۳۳٪ در موش سوری گردید (۱۸). این نتایج که بیانگر کاهش درد حاد به وسیله تجویز سیستمیک اوژنول می‌باشد، با نتایج حاصل از آزمایشات مطالعه حاضر همخوانی ندارد. براساس یافته‌های تحقیق حاضر، تزریق موضعی (زیرجلدی) اوژنول به پای مخالف، تأثیری بر بی‌دردی نداشته، درحالی‌که تزریق سیستمیک (داخل صفاقی) آن موجب تعدیل درد در مرحله مزمن گردید. این نتایج بیانگر آن است که اوژنول علاوه بر اثرات محیطی از طریق مرکزی نیز موجب بی‌دردی شده است.

با توجه به شواهد موجود، اوژنول در محل التهاب علاوه بر ایجاد بی‌حسی موضعی، با مهار متابولیسم آراشیدونیک اسید مانع سنتز پروستاگلاندین‌ها (پروستاگلاندین E و ترومبوکسان‌ها) می‌شود و از این طریق سبب کاهش پاسخ التهابی در مرحله مزمن تست فرمالین می‌شود (۷۶)؛ از طرف دیگر کاهش التهاب و کاهش پیامهای ارسالی درد در مرحله حاد موجب کاهش پلاستیستی و تغییرات عملی در شاخ خلفی نخاع با کاهش آزادسازی ترانسمیترهایی نظیر ماده P- و اسید آمینه‌های تحریکی از انتهای فیبرهای عصبی می‌شود. با توجه به نقش این واسطه‌های عصبی در افزایش تحریک‌پذیری سیناپسی و حساس‌نمودن پاسخهای درد، بدین ترتیب اوژنول باعث کاهش درد در مرحله مزمن تست فرمالین می‌شود (۱۵، ۱۶، ۲۱).

به نظر می‌رسد تزریق داخل صفاقی اوژنول از طریق چند روند سبب کاهش درد مرحله مزمن در تست فرمالین می‌شود. اوژنول به دلیل شباهت ساختمانی و عملی با کاپسایسین بر گیرنده‌های کاپسایسین در انتهای فیبرهای اولیه درد تأثیر می‌گذارد و از آزادسازی ماده P جلوگیری می‌کند؛ به همین دلیل آنتاگونیست کاپسایسین اثر ضددردی اوژنول را مهار می‌کند (۵، ۱۰)؛ همچنین، تحقیقات اخیر نشان داده است که

جدول ۱- مقایسه میانگین نمره درد در گروههای دریافت‌کننده مقادیر مختلف اوژنول (زیرجلدی) با گروه شاهد در مراحل حاد و مزمن تست فرمالین (تعداد=۸)

نمره درد مرحله مزمن	نمره درد مرحله حاد	گروهها
۲/۳۲±۰/۰۶	۲/۵۴±۰/۰۴	۱- شاهد (سرم فیزیولوژی (s.c.
۱/۶۸±۰/۰۷**	۱/۴۵±۰/۱۳*	۲- اوژنول (۱۲/۵ mg/rat)
۱/۲۰±۰/۰۸*	۱/۰۰±۰/۱۶**	۳- اوژنول (۲۵ mg/rat)
۰/۸۲±۰/۰۲**	۰/۵۶±۰/۱۳*	۴- اوژنول (۵۰ mg/rat)
۲/۱۵±۰/۰۶	۲/۴۰±۰/۰۷	۵- اوژنول (۵۰ mg/rat پای چپ)

* اختلاف آماری ($P < 0/01$) با گروه شاهد را نشان می‌دهد.

** اختلاف آماری ($P < 0/001$) با گروه شاهد را نشان می‌دهد.

بحث

مطالعاتی که تاکنون در مورد اوژنول صورت گرفته است، عمدتاً در مورد اثرات ضدعقونی، بی‌حس‌کنندگی، ضدالتهابی و نیز اثر ضدصرعی آن بوده است (۳، ۱۴۶). در تحقیق حاضر برای بررسی اثرات ضد درد اوژنول از تست فرمالین استفاده شد؛ زیرا در میان وجوه مختلف درد مزمن، تست فرمالین به‌عنوان یک مدل معتبر تحقیقاتی شناخته شده است که حساسیت مرکزی بوجود آمده در سطح نخاعی را بعد از التهاب محیطی مشخص می‌سازد؛ همچنین گزارشات متعددی دال بر دخالت سیستم‌های نروترانسمیتری نظیر ماده P، گلوتامات، سروتونین و هیستامین در پاسخ فرمالینی ارائه شده است (۱۵، ۱۶، ۱۷).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تزریق اوژنول به‌صورت وابسته به مقدار، موجب کاهش درد در هر دو مرحله حاد و مزمن تست فرمالین در موش صحرایی گردید و مؤید مطالعاتی است که برای اوژنول و مشتقات آن، اثرات تسکین درد گزارش نموده‌اند (۵، ۱۸، ۱۹، ۲۰).

در مطالعه Ahmad و همکاران در سال ۲۰۰۰، اوژنول با دوزهایی نزدیک به مقادیر استفاده‌شده در این تحقیق، موجب

اوژنول سبب مهار جریان کلسیم به داخل سلول می‌گردد و احتمالاً از این طریق موجب مهار رهاسازی نوروترانسمیترها از پایانه‌های فیبرهای درد در شاخ خلفی نخاع می‌شود و در نهایت باعث کاهش درد در مرحله مزمن تست فرمالین می‌گردد (۲۲)؛ علاوه بر آن ممکن است اوژنول با تأثیر بر گیرنده‌های آدرنرژیک و تداخل عمل با سیستم آدرنرژیک درگیر، در تعدیل درد، اثرات ضد درد خود را اعمال نماید (۱۱). با توجه به یافته‌های این پژوهش می‌توان پیشنهاد نمود

که در دندانپزشکی به هنگام استفاده از ترکیبات اوژنول در پانسمان و سیمان موقت دندان، داروهای مسکن کمتر تجویز گردد.

به‌طور کلی اوژنول می‌تواند از راه‌های مختلفی موجب بی‌دردی شود. برای تعیین روند دقیق عملکرد اوژنول انجام تحقیقات گسترده‌تری لازم است که دربرگیرنده چگونگی تداخلات عمل آن با سایر نوروترانسمیترهای سیستم بی‌دردی از جمله نوراپینفرین، سروتونین و اپیوئیدها باشد.

منابع:

- 1-Murray PE, Hafez AA, Smith AJ, Cox Cf. Bacterial microleakage and pulp inflammation associated with various restorative materials. *Dent Mater* 2002; 18:470-80.
- 2-Hodosh AJ, Hodosh S, Hodosh M. Potassium nitrate-Zinc oxide eugenol temporary cement for provisional crowns to diminish postpreparation tooth pain. *J Prosthet Dent* 1993; 70: 493-95.
- 3-Sladky KK, Swanson CR, Stoskopf MK, Loomis MR, Lewbart GA. Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachyomus*). *Am J Vet Res* 2001; 62: 337-42.
- 4-Brodin P. Differential inhibition of A, B and C fibers in the rat vagus nerve by lidocaine, eugenol and formaldehyde. *Arch Oral Biol* 1985; 30: 477-80.
- 5-Ohkubo T, Shibata M. The selective capsaicin antagonist capsazepine abolishes the antinociceptive action of eugenol and guaiacol. *J Dent Res* 1997; 76: 848-51.
- 6-Dohi T, Anamura S, Okamoto H, Tsujimoto A. Inhibition of lipoxygenase of rat dental pulp and human platelets by phenolic dental medicaments. *Dent Jap (Tokyo)* 1990;27: 45-49.
- 7-Thompson D, Eling T. Mechanism of inhibition of prostaglandin H synthase by eugenol and other phenolic peroxidase substrates. *Mol Pharmacol* 1989; 36: 809-17.
- 8-Shin BK, Lee EH, Kim HM. Suppression of L-histamine decarboxylase mRNA expression by methyleugenol. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 232: 188-91.
- 9-Kim HM, Lee EH, Kim CY, Chung JC, Kim SH, Lim JP, Shin TY. Antianaphylactic properties of eugenol. *Pharmacol Res* 1997; 36: 475-80.
- 10-Patacchini R, Maggi CA, Meli A. Capsaicin-like activity of some natural pungent substances on peripheral endings of visceral primary afferents. *Arch Pharmacol* 1990; 342: 72-77.
- 11-Huang YC, Wu BN, Lin YT, Chen SJ, Chiu CC, Cheng CJ, Chen IJ. Eugenodilol: a third-generation beta-adrenoceptor blocker, derived from eugenol, with alpha-adrenoceptor blocking and beta2-adrenoceptor agonist-associated vasorelaxant activities. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 34: 10-20.
- 12-Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: A quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977; 4: 161-74.
- 13-Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar, S., Rosland, J.H., Hole, K., The formalin test: An evaluation of the method. *Pain* 1992; 51: 5-17.
- 14-Contar JD, Carlini EA. Pharmacological and toxicological profile of benzyleugenol, a phenylpropene derivative possessing anticonvulsant properties. *Braz J Med Biol Res* 1987; 20: 495-510.
- 15- Willis WD. Role of neurotransmitters in sensitization of pain responses. *Ann N Y Acad Sci* 2001 Mar; 933: 142-56.

Review.

16-Hunter JC, Singh L. Role of excitatory amino acid receptors in mediation of the nociceptive response to formalin in the rat. *Neurosci* 1994; 174: 217-21.

17-Coderre TJ, Vaccarino AL, Melzack R. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain Res* 1990; 535: 155-58.

18-Ahmad M, Amin S, Islam M, Takahashi M, Okuyama E, Hossain CF. Analgesic principle from *Abutilon indicum*. *Pharmazie* 2000; 55: 314-16.

19-DuPlooy WJ, Swart L, VanHuysteen GW. Poisoning with *Boophane disticha*: a forensic case. *Hum Exp Toxicol* 2001; 20: 277-78.

20-Garrido G, Gonzalez D, Delporte C, Backhouse N, Quintero G, Nunez-Selles AJ, Morales MA. Analgesic and anti-inflammatory effects of *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *Phytother Res* 2001; 15: 18-21.

21-Terayama R, Guan Y, Dubner R, Ren K. Activity-induced plasticity in brain stem pain modulatory circuitry after inflammation. *Neuroreport* 2000; 11: 1915-19.

22-Chen SJ, Wang MH, Chen IJ. Antiplatelet and calcium inhibitory properties of eugenol and sodium eugenol acetate. *Gen Pharmacol* 1996; 27: 629-33.