

Effect of Prenatal Stresses on the Response to Pain in Rats

Soufi Abadi M.¹ *Phd*, HaghdoostYazdi H.* *PhD*, Abbasnejad A.A.² *PhD*, Amoli N.³ *BSc*, Ghadimi F.³ *BSc*

*Physiology Department, Medicine Faculty, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

¹Physiology Department, Medicine Faculty, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

²Basic Sciences Department, Medicine Faculty, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran

³Anesthetist Department, Paramedical Faculty, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

Abstract

Aims: Due to different types of stress, it is important to recognize its adverse effects on the nervous system. This study was done to investigate the effect of three types of common stresses in modern living environment i.e. electromagnetic waves, immobilization and disturbance, individually and combined on pain threshold in infant rats.

Materials & Methods: In this experimental study, 40 pregnant female Sprague rats and all their male infants were studied. Female rats were divided into 5 control, electromagnetic stress, immobilization stress, disturbance stress and combined stress groups. From eighth day of gestation, pregnant rats of stress groups were exposed to stress for 10 consecutive days. 75 days postpartum (after maturity), male rats were subjected to formalin pain test. Measuring the pain intensity was done via scale "zero" (putting the feet on the ground completely), "1" (putting the paw on the ground), "2" (raising the feet) and "3" (biting or licking the feet). Data were analyzed using one-way ANOVA and Tukey's post hoc tests.

Findings: The mean of pain severity at the acute phase of the formalin test between each stress groups and the control group was not significant ($p>0.05$). The mean of pain severity of the interphase stage of the formalin test was significant only between the electromagnetic stress and the control groups ($p<0.05$). The mean of pain severity at the chronic stage of formalin test was significant between each of the combined stress ($p<0.01$) and the immobility stress ($p<0.05$) groups and the control group.

Conclusion: Stress during pregnancy affects the pain behavior of the mature rats.

Keywords

Pain (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68010146>);

Rats (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68051381>);

Prenatal Stress;

Formalin Test

* Corresponding Author

Tel: +982813336001

Fax: +982813324971

Address: Physiology Department, Medicine Faculty, Qazvin University of Medical Sciences, Shahid Bahonar Boulevard, Qazvin, Iran

hhaghdoost@yahoo.com

Received: October 20, 2013

Accepted: March 6, 2014

ePublished: April 1, 2014

اثر استرس‌های زمان جنینی بر پاسخ به درد در موش‌های صحرایی

محمد صوفی‌آبادی PhD

گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

هاشم حق‌دوست یزدی * PhD

گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

عباسعلی عباس‌نژاد PhD

گروه علوم پایه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران

نرگس آملی BSc

گروه هوشبری، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

فاطمه قدیمی BSc

گروه هوشبری، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

چکیده

اهداف: با توجه به شیوع انواع مختلف استرس، شناسایی عوارض آن بر سیستم عصبی اهمیت دارد. این پژوهش با هدف بررسی تاثیر سه گونه استرس شایع در محیط زندگی نوین یعنی امواج الکترومغناطیسی، بی‌حرکتی و تراجم به‌طور منفرد و توأمان بر آستانه درد موش‌های صحرایی نر نوزاد انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۴۰ سر موش صحرایی ماده حامله نژاد اسپراگ و تمامی نوزادان نر آنها، مورد مطالعه قرار گرفتند. موش‌های صحرایی ماده به پنج گروه کنترل، استرس الکترومغناطیسی، استرس بی‌حرکتی، استرس تراجم و استرس توأم تقسیم شدند. از روز هشتم حاملگی، موش‌های حامله گروه‌های استرس برای ۱۰ روز متوالی مورد استرس قرار گرفتند. ۷۵ روز بعد از زایمان (پس از بلوغ)، نوزادان نر مورد آزمایش درد با فرمالین قرار گرفتند. محاسبه شدت درد با مقیاس "صفر" (گذاشتن کامل پا روی زمین)، "۱" (گذاشتن پنجه پا روی زمین)، "۲" (بالا بردن پا) و "۳" (گازگرفتن یا لیسیدن پا) انجام شد. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آنالیز واریانس یک‌طرفه و تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: میانگین میزان درد در مرحله حاد آزمون فرمالین بین هر یک از گروه‌های استرس و گروه کنترل معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). میانگین میزان درد در مرحله اینترنتاز آزمون فرمالین تنها بین گروه استرس الکترومغناطیسی و گروه کنترل معنی‌دار بود ($p < 0.05$). میانگین میزان درد در مرحله مزمن آزمون فرمالین بین هر کدام از گروه‌های استرس توأم ($p < 0.01$) و استرس بی‌حرکتی ($p < 0.05$) با گروه کنترل معنی‌دار بود.

نتیجه‌گیری: استرس دوره حاملگی بر رفتارهای درد موش‌های صحرایی پس از بلوغ موثر است.

کلیدواژه‌ها: درد، موش صحرایی، استرس دوران جنینی، آزمون فرمالین

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۸/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۱۵

*نویسنده مسئول: hhaghdoost@yahoo.com

مقدمه

استرس در دوران بارداری، عامل بالقوه ایجاد برخی از بیماری‌های عصبی برای مادر و جنین است^[1] و می‌تواند به تغییر فعالیت محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال در دوران جنینی و پس از آن منجر شود^[2]. این اختلال با تاثیر بر ساختار و عملکرد مغز، فرآیندهای پس از تولد سیستم عصبی، مانند پاسخ به عوامل محرک، پیام‌رسانی حس درد و غیره را مختل می‌کند. مطالعه در موش‌های صحرایی نشان می‌دهد که استرس دوران جنینی به‌صورت وابسته به جنسیت و زمان، تشنج ایجادشده به‌وسیله پیلوکارپین را تشدید می‌کند و میزان کورتیکوسترون خون را نیز بالا می‌برد^[3]. به علاوه، استرس دوران بارداری ممکن است باعث تغییر در تکامل مغزی شود و با ایجاد ارتباطات نورونی غیرمعمول، در عملکرد پایدار مغزی اختلال ایجاد نماید^[4]. هانس و همکاران نشان داده‌اند که عوامل استرس‌زایی مانند حوادث زندگی، در زمان بارداری بر تکامل مغز، اندازه دور سر و وزن جنین هنگام تولد موثر هستند^[5].

به دلیل حساسیت دوران بارداری، مصرف بسیاری از داروها باید با احتیاط صورت گیرد. مصرف مواد مخدر و به‌ویژه مورفین در این دوران علاوه بر اختلال در یادگیری فضایی موش‌های صحرایی، موجب تغییر در پاسخ گیرنده‌های اوبیوئیدی و در نتیجه تغییر پاسخ به درد می‌شود^[6,7]. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که مواجهه شدن با انواع استرس‌های فیزیکی-محیطی در دوران جنینی، پاسخ‌های رفتاری موجودات زنده به محرک‌های مختلف محیط زندگی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. حس درد یکی از رفتارهایی است که شدت احساس آن در اثر اعمال استرس می‌تواند دستخوش تغییر شود^[8]. البته اثر استرس دوران جنینی بر آستانه احساس درد می‌تواند بسته به نوع، شدت و زمان آن متفاوت و گاه متناقض باشد^[9].

با توجه به فقدان اطلاعات در زمینه اثر چند استرس توأم در زمان جنینی بر فرآیند درد و در نظر گرفتن این نکته که سیستم عصبی رشد و تکامل اصلی خود را در دوران جنینی طی می‌کند، این پژوهش با هدف بررسی تاثیر سه گونه استرس شایع در محیط زندگی نوین یعنی امواج الکترومغناطیسی، بی‌حرکتی و تراجم به‌طور منفرد و توأمان بر آستانه درد موش‌های صحرایی نر نوزاد انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی ۴۰ سر موش صحرایی ماده حامله نژاد اسپراگ (سرم‌سازی رازی؛ ایران) و تمامی نوزادان نر آنها، مورد مطالعه قرار گرفتند. تمامی موش‌ها در شرایط مناسب از نظر نور و درجه حرارت در حیوان‌خانه دانشگاه نگهداری شده و دسترسی نامحدود به آب و غذا داشتند و مراقبت دایمی از آنها طبق دستورالعمل‌های اخلاقی بین‌المللی کار با حیوانات به عمل آمد.

ابتدا فرمالین ۲/۵٪ (۴۰ میکرولیتر) به درون پنجه کف پای راست تزریق و بلافاصله با انتقال حیوان به جعبه مخصوص پلکسی گلاس، رفتارهای درد حیوان برای هر ۱۵ ثانیه و در کل به مدت ۶۰ دقیقه مورد مشاهده قرار گرفت. محاسبه شدت درد با مقیاس "صفر" (گذاشتن کامل پا روی زمین)، "۱" (گذاشتن پنجه پا روی زمین)، "۲" (بالا بردن پا) و "۳" (گازگرفتن یا لیسیدن پا) انجام و هر دقیقه ثبت شد [10].

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 18 و آزمون‌های آنالیز واریانس یک‌طرفه (برای مقایسه کلی) و تعقیبی توکی (برای مقایسه نتایج بین گروه‌ها) تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها

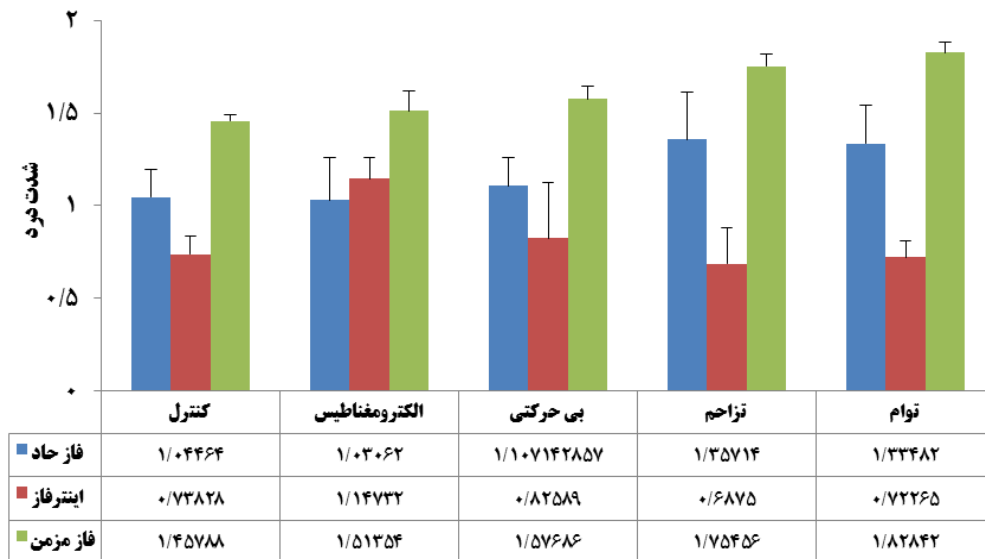
با تزریق زیرجلدی فرمالین به کف پا، هر دو مرحله درد حاد و مزمن در موش‌های صحرایی همه گروه‌ها مشاهده شد که اختلاف آماری معنی‌داری نداشت ($p > 0.05$).

میانگین میزان درد در مرحله حاد آزمون فرمالین بین هر یک از گروه‌های استرس و گروه کنترل معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). میانگین میزان درد مرحله اینترفاز آزمون فرمالین تنها بین گروه استرس الکترومغناطیسی و گروه کنترل معنی‌دار بود ($p < 0.05$). میانگین میزان درد در مرحله مزمن آزمون فرمالین به‌ویژه در دقایق ۴۰-۱۵ بین هر کدام از گروه‌های استرس توام ($p < 0.01$) و استرس بی‌حرکتی ($p < 0.05$) با گروه کنترل معنی‌دار بود (نمودار ۱).

موش‌های صحرایی ماده پس از تایید حاملگی با مشاهده پلاک واژنی به پنج گروه کنترل (دوران بارداری طبیعی بدون استرس)، استرس الکترومغناطیسی (هر روز ۴ ساعت در معرض امواج الکترومغناطیسی با شدت ۱/۲ میلی‌تسلا و فرکانس ۵۰ هرتز)، استرس بی‌حرکتی (روزی ۲ بار استرس بی‌حرکتی به مدت ۳۰ دقیقه با قراردادن در رستریز)، استرس تزاحم (نگهداری همه موش‌های گروه در یک قفس کوچک) و استرس توأم (ترکیب سه استرس مشابه استرس هر گروه منفرد) تقسیم شدند. از روز هشتم حاملگی، موش‌های حامله گروه‌های استرس برای ۱۰ روز متوالی مورد استرس قرار گرفتند. برای تولید میدان الکترومغناطیسی از دو سلنوئید با ابعاد مشابه و حدود ۱۷۸۰ دور که با یکدیگر سری شده و یک سلنوئید طویل ۳۵۶۰ دوری را تشکیل دادند استفاده شد. نقطه قرارگیری حیوانات در وسط این دو سلنوئید بود.

۷۵ روز بعد از زایمان (پس از بلوغ)، نوزادان نر مورد آزمایش درد با فرمالین قرار گرفتند. این محرک اثر خود را در دو فاز نشان می‌دهد. فاز اول یا فاز حاد بلافاصله بعد از تزریق فرمالین شروع شده و به مدت ۵ دقیقه ادامه می‌یابد. دومین فاز ۱۵-۱۰ دقیقه بعد از تزریق فرمالین آغاز و تا حدود یک ساعت تداوم پیدا می‌کند. فاز اول نتیجه تحریک گیرنده‌های حس درد در پا بوده و دومین فاز هم به فرآیندهای التهابی و تشدید درد بر اثر حساس شدن نورون‌های سیستم مرکزی درد مربوط می‌شود. فاصله بین این دو مرحله اینترفاز نامیده می‌شود که در آن درد فروکش می‌کند [12, 13].

نمودار ۱) میانگین میزان درد در فاز حاد، اینترفاز و فاز مزمن آزمون فرمالین در ۵ گروه مورد مطالعه طی ۶۰ دقیقه پس از تزریق



بحث

در این مطالعه اثر استرس دوران جنینی بر رفتار درد با آزمون فرمالین در موش‌های صحرایی بررسی شد. الگوی درد در موش‌های تحت استرس جنینی از موش‌های طبیعی اندکی متفاوت است. درد از جمله تجاربی است که هر انسانی در طول عمر خود با آن مواجه می‌شود. ابتلا به برخی از دردها در درازمدت اثرات نامطلوب روحی و روانی دارد و به همین دلیل، تلاش‌های زیادی در زمینه شناخت مکانیسم‌های درد و درمان آن صورت گرفته است [11].

مواجهه با انواع استرس‌های فیزیکی - محیطی در دوران جنینی، پاسخ‌های رفتاری موجودات زنده به محرک‌های مختلف محیطی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. برای مثال، اعمال استرس متناوب دوره‌ای (سر و صدا با شدت ۹۰-۱۲۰ دسی‌بل و فرکانس پایین هنگام استراحت شبانه) به موش‌های باردار، آستانه درد مزمن (تونیک) را در فرزندان نر و ماده بالغ‌شده متاثر می‌سازد [8]. اعمال استرس بی‌حرکتی متناوب (از روز ۱۶ تا ۲۱) نیز موجب کاهش رفتارهای درد مانند لرزش و خم کردن دست در فاز دوم درد فرمالین می‌شود ولی دوره اینترفاز را به ویژه در موش‌های ماده طولانی‌تر می‌نماید [9]. در مطالعه حاضر، میزان درد تونیک در بیشتر گروه‌های تحت استرس جنینی افزایش یافت که ممکن است علت این تفاوت نتایج، تفاوت‌های ژنتیکی نمونه‌های مورد مطالعه با هم یا یکسان نبودن نوع، شدت و دوره استرس اعمال شده در تحقیقات مختلف باشد.

مصرف برخی ترکیبات توسط مادر می‌تواند بر فعالیت سیستم‌های مهاری اثر منفی گذاشته و حساسیت سیستم‌های تحریکی مغز حیوانات تولدیافته را افزایش دهد که موجب می‌شود این حیوانات رفتارهای غیرطبیعی زیادی از خود نشان دهند [14-16]. در مورد مکانیسم افزایش حساسیت به درد در اثر استرس دوران جنینی هنوز با قطعیت نمی‌توان اظهار نظر کرد، ولی آزمایش‌های متعددی نشان داده است که میزان کورتیکوسترون پلاسمای جنین مادران استرس دیده افزایش می‌یابد که بالا بودن سطح این هورمون‌ها در بروز تغییرات ساختمانی و عملی دستگاه عصبی جنین‌های تحت استرس موثر است [17, 18]. احتمالاً، تغییرات نوروپاتولوژیک استرس از عمل نوروتوکسیک فوق‌العاده زیاد گلوکوکورتیکوئیدها ناشی می‌شود که از غده آدرنال طی استرس مادر از طریق جفت به خون جنین آزاد می‌شوند و گلوکوکورتیکوئیدهای آزاد شده از مادر هنگام استرس می‌توانند حساسیت گیرنده‌های دوپامینی، گلوتاماتی و اپیوئیدی را در نواحی متعددی از مغز جنین به ویژه در ناحیه تگمنتوم شکمی و هسته آکومبیس تغییر دهند [19].

برخی از محققان معتقدند که تاثیر استرس بر محور هیپوفیز - آدرنال می‌تواند بر بت‌آندورفین داخلی و رسپتورهای μ - اپیوئیدی و سیستم دوپامینی مغز تاثیر جدی داشته و میزان پاسخگویی حیوانات

استرس دیده را به اثر ضددردی مورفین کم کند، لذا استرس می‌تواند باعث القای تغییر در سازمان‌بندی و نحوه پاسخگویی حیوانات به اپیوئیدهای درون‌زاد که در تعدیل درد مزمن نقش اساسی دارند، شود [18, 20, 21]. همچنین تغییرات دستگاه عصبی ناشی از استرس، ممکن است شامل کانال‌های یونی و تغییر در کنداکتانس یون‌ها، فعالیت گیرنده‌ها، نورون‌های آوران مسیر درد و تغییر در انتقال پیام‌های زیستی نیز باشد و پاسخ به محرک دردزا از این طریق افزایش یابد [22-25]. بنابراین نتایج استرس‌های بی‌حرکتی و تراحم ممکن است مسیرهای مرتبط به انتقال درد، مراکز شناخت و تفسیر درد و نیز سیستم سرکوب‌کننده درد را تحت تاثیر قرار دهند. در مطالعه حاضر، از میدان الکترومغناطیس به عنوان نوعی دیگر از استرس استفاده شد. استرس الکترومغناطیس مکانیسم عمل متفاوتی نسبت به استرس‌زاهای فیزیکی و روانی دیگر دارد. مطالعات بیوشیمیایی در مورد اثر میدان‌های مغناطیسی نشان می‌دهند که تجزیه کربوهیدرات‌ها، لیپیدها و متابولیسم پروتئین‌ها در اثر قرارگرفتن در معرض این میدان‌ها تغییر می‌کند و این میدان‌ها باعث تغییر در سطح گلوکاگون و تیروکسین خون می‌شوند. در بی استفاده از میدان‌ها، مجموعه‌ای از فعالیت‌های سلسله‌وار آغاز می‌شود که پیام را از غشای سلول به طرف هسته و نیز محتوای ژنتیکی هدایت می‌کند. میدان‌های الکترومغناطیسی در بدن انسان عملکرد اکثر ارگان‌ها، پارامترهای بیوشیمیایی، فعالیت آنزیم‌های سرم، توزیع یون‌ها و پتانسیل غشای سلولی را تغییر می‌دهند [26, 27].

نتیجه‌گیری

استرس دوره حاملگی بر رفتارهای درد موش‌های صحرایی پس از بلوغ موثر است و احتمالاً اثر چند استرس توأم بر سیستم درک و احساس درد مزمن، از استرس تنها بیشتر است.

تشکر و قدردانی: این طرح پژوهشی با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین و دانشکده پیراپزشکی انجام شده است. مجربان طرح از زحمات و همکاری این واحدها تشکر می‌نمایند.

تاییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

منابع مالی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

منابع

- Schöpfer H, Palme R, Ruf T, Huber S, Aperea f. Effects of prenatal stress on hypothalamic-pituitary-adrenal [HPA] axis function over two generations of guinea pigs. *Gen Comp Endocr.* 2012;176(1):18-27.
- Kofman O. The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders. *Neurosci Biobehav Rev.* 2002;26(4):457-70.

- 16- Cannizzaro C, Cannizzaro E, Gagliano M, Mangiapane N. Behavioural responsiveness to picrotoxin and desipramine in adult rats prenatally exposed to different benzodiazepine receptor agonists. *Neuropsychopharmacol*. 1995;5(4):523-6.
- 17- Pivina SG, Shamolina TS, Akulova VK, Ordian NE. Sensitiveness to social stress in female rats with alteration of the pituitary-adrenal axis stress reactivity. *Russ Fiziol Zh IM Sechenova*. 2007;93(11):1319-25.
- 18- Nazari Z, Sahraei H, Sadoughi M. The effect of chronic stress in pregnant mothers on the responsiveness to morphine in mice: a behavioral sensitization study. *Yafteh*. 2008;10(3):47-56.
- 19- Fujioka T, Sakata Y, Yaamaguchi K, Shibasaki T, Kato H, Nakamura S. The effects of prenatally stress the development of hypothalamicparaventricular neurons in fetal rats. *Neuroscience*. 1999;92(3):1079-88.
- 20- Kademian S, Pérez MF, Keller EA. Perinatal undernutrition: changes in brain opiate receptor density. *Nutr Neurosci*. 2002;5(1):53-7.
- 21- Huizink AC, Mulder EJ, Buitelaar JK. Prenatal stress and risk for psychopathology: specific effects or induction of general susceptibility. *Psychol Bulletin*. 2004;130(1):115-42.
- 22- Shahraki MR, MirShekari H, Palan MJ. The comparison of nociceptive effect of Teucrium polium and morphine in female rats. *Horizon Med Sci*. 2006;12(1):10-4.
- 23- Heine S, Michalakakis S, Kallenborn GW, Lu R, Lim HY, Weiland J, et al. CNGA3: a target of spinal nitric oxide/cGMP signaling and modulator of inflammatory pain hypersensitivity. *J Neurosci*. 2011;31(31):11184-92.
- 24- Tegeder I, Scheving R, Wittig I, Geisslinger G. SNO-ing at the nociceptive synapse? *Pharmacol Rev*. 2011;63(2):366-89.
- 25- Geisler S, Béroud A, Zahm DS, Rostène W. Brain neurotensin, psychostimulants, and stress: emphasis on neuroanatomical substrates. *Elsevier pept*. 2006;27(10):2364-84.
- 26- Celikozlu SD, Ozyurt MS, Cimbiz A, Yardimoglu MY, Cayci MK, Ozay Y. The effects of long-term exposure of magnetic field via 900-MHz GSM radiation on some biochemical parameters and brain histology in rats. *Electromagnetic Biol Med*. 2012;31(4):344-55.
- 27- Zare S, Hayatgeibi H, Alivandi S, Ebadi AG. Effects of whole-body magnetic field on changes of glucose and cortisol hormone in guinea pigs. *Am J Biochem Biotechnol*. 2005;1(4): 217-9.
- 3- Sadaghiani MM, Saboory E. Prenatal stress potentiates pilocarpine-induced epileptic behaviors in infant rats both time and sex dependently. *Epil Behav*. 2010;18(3):166-70.
- 4- Rangon CM, Fortes S, Lelièvre V, Leroux P, Plaisant F, Joubert C, Lanfumey L, Cohen-Salmon C, Gressens P. Chronic mild stress during gestation worsens neonatal brain lesions in mice. *J Neurosci*. 2007;27(28):7532-40.
- 5- Hansen D, Lou HC, Nordentoft M, Pryds OA, Jensen FR, Nim J, Hemmingsen RP. The significance of psychosocial stress for pregnancy course and fetal development. *Ugeskr Laeger*. 1996;158(17):2369-72.
- 6- Slamberova R, Schindler CJ, Pometlova M, Urkuti C, Purov-Sokol JA, Vathy I. Prenatal morphine exposure alters learning and memory in male rats. *Physiol Behav*. 2001;73(1-2):93-103.
- 7- Chiou LC, Yeh GC, Fan SH, How CH, Chuang KC, Tao PL. Prenatal morphine exposure decreases analgesia but not K⁺ channel activation. *Neuroreport*. 2003;14(2):239-42.
- 8- Sarkaki A, Heydari A, Shahraki M. The effect of noise stress during fetal life on pain in rats. *J Kerman Uni Med Sci*. 2000;7(2):53-9.
- 9- Butkevich IP, Vershinina EA. Prenatal stress alters time characteristics and intensity of formalin-induced pain responses in juvenile rats. *Brain Res*. 2001;915(1):88-93.
- 10- Azhdari Zarmehri H, Semnanian S, Fathollahi Y, Erami E, Khakpay R, Azizi H, et al. Intra-periaqueductal gray matter microinjection of orexin-A decreases formalin-induced nociceptive behaviors in adult male rats. *J Pain*. 2011;12(2):280-7.
- 11- Dray A, urban L. New pharmacological strategies for pain relief. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*. 1996;36(1):253-80.
- 12- Porro CA, Cavazzuti M. Spatial and temporal aspects of spinal cord and brainstem activation in the formalin pain model. *Prog Neurobiol*. 1993;41(5):565-07.
- 13- Puig S, Rivot JP, Benson JM. Effect of subcutaneous administration of the chemical halogen formalin, on 5-HT metabolism in the nucleus raphe Magnus and freely moving rats. *Brain Res*. 1992;36(5):112-24.
- 14- Yanga J, Lia W, Liub X, Lia Z, Lib H, Yangb G, et al. Enriched environment treatment counteracts enhanced addictive and depressive-like behavior induced by prenatal chronic stress. *Brain Res*. 2006;1125(1):132-7.
- 15- Cagiano R, De Salvia MA, Perischella M, Renna G, Tattoli M, Cuomo V. Behavioural changes in the offspring of rats exposed to diazepam during gestation. *Eur J Pharmacol*. 1990;177(1):67-4.