

مقاله پژوهشی

## نقش گیرنده‌های اپیوئیدی و کانابینوئیدی نوع ۱ مرکزی در اثر ضددردی کورکومین در درد عضلانی ناشی از فرمالین در موش‌های صحرایی

نبات نقش‌بندی، اسماعیل تمدن‌فرد<sup>\*</sup>، امیر عرفان‌پرست، فرهاد سلطانعلی‌نژاد تقی‌آباد

بخش فیزیولوژی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

پذیرش: ۲ مرداد ۱۴۰۲

دریافت: ۴ تیر ۱۴۰۲

### چکیده

**زمینه و هدف:** کورکومین، ماده فعال بیولوژیکی زردچوبه (کورکوما لونگا یا *Curcuma longa*)، بر پردازش درد در سطوح مختلف تأثیر می‌گذارد. مکانیسم‌های موضعی اثر کورکومین تا حدودی شناخته شده است اما اثرات مرکزی در سطوح نخاعی و فوق‌نخاعی کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. در این مطالعه، تأثیر مصرف خوراکی کورکومین بر درد عضلانی ناشی از فرمالین مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، نالوکسان (آنتاگونیست غیراختصاصی گیرنده‌های اپیوئیدی) و آم‌۲۵۱ (آنتاگونیست گیرنده‌های کانابینوئیدی نوع ۱) برای روشن کردن مکانیسم مرکزی احتمالی عمل کورکومین استفاده شد. **روش‌ها:** به‌منظور تزریقات داخل بطن مغزی، یک عددکانول راهنما در بطن جانبی سمت چپ مغز در موش‌های صحرایی بیهوش شده قرار داده شد. درد فرمالینی عضلانی با تزریق زیر جلدی فرمالین (۲/۵ درصد، ۵۰ میکرولیتر) به عضله گاستروکنمیوس حیوان ایجاد شد و رفتارهای درد شامل تعداد لرزش‌ها و مدت زمان لیسیدن پنجه پای خلفی در فواصل زمانی پنج دقیقه‌ای به مدت یک ساعت ثبت شد. **یافته‌ها:** به‌دنبال تزریق عضلانی فرمالین یک درد دو مرحله‌ای ایجاد شد. تجویز خوراکی ۲۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم به کیلوگرم وزن بدن کورکومین موجب کاهش معنی‌دار (به ترتیب  $p < 0.01$  و  $p < 0.001$ ) شاخص‌های درد هر دو مرحله درد عضلانی شد. تزریق داخل بطن مغزی نالوکسان و آم‌۲۵۱ به‌تنهایی اثر معنی‌داری بر شدت درد نگذاشت ( $p > 0.05$ )، اما تزریق آن‌ها از کاهش درد ایجاد شده توسط تجویز خوراکی کورکومین جلوگیری کرد ( $p < 0.001$ ). همه درمان‌های ذکر شده در بالا فعالیت حرکتی را تغییر ندادند. **نتیجه‌گیری:** نتایج مطالعه حاضر اثر تخفیف‌دهندگی درد عضلانی توسط کورکومین را نشان دادند. گیرنده‌های اپیوئیدی و کانابینوئیدی مرکزی ممکن است در اثر ضددردی کورکومین نقش داشته باشند.

**واژه‌های کلیدی:** بطن جانبی، درد عضلانی، کورکومین، گیرنده‌های اپیوئیدی، گیرنده‌های کانابینوئیدی

### مقدمه

درمانی جدید با افزایش کارایی، عوارض جانبی و هزینه کمتر توأم با بهبود کیفیت زندگی، یکی از اهداف اصلی در مدیریت درمان درد می‌باشد [۲].

از مواد موثر گیاهان دارویی به کرات در درمان انواع مختلف درد استفاده می‌شود. یکی از این مواد کورکومین است که ماده فعال زردچوبه<sup>۱</sup> می‌باشد و خواص بسیار گسترده‌ای از جمله اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد التهابی،

درد یک مشکل بهداشت عمومی جهانی است که بر کیفیت زندگی و مسائل اقتصادی اثرات زیانباری بر جای می‌گذارد و به یکی از مهمترین مسائل پزشکی مدرن تبدیل شده است [۱]. داروهای ضد درد از جمله اپیوئیدها، داروهای ضدالتهابی استروئیدی و غیراستروئیدی، داروهای ضدسرع و ضداضطراب از جمله مواردی هستند که معمولاً برای درمان انواع درد استفاده می‌شوند. اثرات جانبی این داروها مثل اعتیاد، عوارض گوارشی و قلبی عروقی استفاده بالینی از آن‌ها را محدود می‌کند [۲]. با توجه به موارد فوق، جستجوی عوامل

<sup>1</sup> Turmeric

## مواد و روش‌ها

### حیوانات استفاده شده

حیوانات مورد استفاده در این مطالعه موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن بین ۲۲۰ تا ۲۵۰ گرم بودند که در گروه‌های ۶تایی در در قفس‌های پلی‌اتیلن در اتاق نگه‌داری موش‌های صحرایی آزمایشگاه فیزیولوژی در دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، با درجه حرارت بین ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد، چرخه روشنایی/تاریکی ۱۲ ساعت نگهداری می‌شدند و دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. تمامی آزمایش‌ها بین ساعت ۱۲ تا ۱۷ انجام گرفتند. قوانین مصوب بر اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی در دانشگاه ارومیه در همه مراحل نگهداری و انجام آزمایش روی موش‌های صحرایی رعایت گردید و مطالعه حاضر با کد IR-UU-AEC-۲۰/۳ مورد تایید کمیته اخلاق دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه قرار گرفت.

### داروهای استفاده شده

داروها و مواد شیمیایی استفاده شده در این مطالعه شامل کوروکومین، نالوکسان و آم‌۲۵۱ تهیه شده از شرکت دارویی سیگما-آلدریج آمریکا بود. محلول سوسپانسیون از کوروکومین در آب مقطر تهیه شد. همچنین، نالوکسان در سالی‌ن نرمال حل گشت و آم‌۲۵۱ در محلول ۵ درصد دی‌متیل سولفوکساید<sup>۴</sup> حل و رقیق شد [۹]. فرمالین ۲/۵ درصد از محلول فرمالین ۳۷/۵ درصد شرکت دارویی مرک آلمان تهیه شد. محلول‌های دارویی ۱۵ دقیقه قبل از تزریقات آماده شدند.

### مراحل تحقیق و گروه بندی حیوانات

تحقیق حاضر در چهار مرحله انجام گرفت:

در مرحله اول، در سه گروه از حیوانات وارد کردن به تنهایی سر سوزن تزریقی و تزریق سالی‌ن نرمال استریل و فرمالین ۲/۵ درصد به داخل عضله گاستروکمیوس انجام شد تا الگوی درد فرمالینی عضلانی در حیوانات بررسی گردد.

در مرحله دوم، اثر خوراندن غلظت‌های مختلف کوروکومین بر رفتار درد ناشی از تزریق فرمالین به داخل عضله گاستروکمیوس بررسی گردید. بر این مبنای، در ۴ گروه آب مقطر (به عنوان حامل کوروکومین) و مقادیر ۶/۲۵، ۲۵، و ۱۰۰

ضدتوموری، ضددیابتی، حفاظت از کبد و سیستم عصبی دارد [۳]. به‌طور متعدد نشان داده شده است که کوروکومین در مدل‌های حیوانی و در آزمایشات بالینی اثرات ضد درد و ضدالتهابی ایجاد می‌کند و به‌نظر می‌رسد اثرات جانبی جدی کمتری نسبت به بسیاری از ضددردهای فعلی داشته باشد [۳]. سیستم‌های اپیوئیدی و کانابینوئیدی درون‌زاد نقش مهمی در تنظیم درد، خلق و خوی، پاداش و اعتیاد بازی می‌کنند. سیستم‌های مذکور در تنظیم روندهای درد و التهاب در سطوح محیطی و مرکزی سیستم عصبی درگیر هستند [۴]. در این زمینه، اثرات ضددردی ناشی از فعال‌شدن گیرنده‌های مذکور در نواحی مختلف از مسیرهای پردازش‌کننده درد از جمله ماده خاکستری دور قنات<sup>۲</sup> که بخشی از سیستم نزولی تنظیم‌کننده درد است، گزارش شده است [۵]. از آنجاکه هر دو سیستم اپیوئیدی و کانابینوئیدی در کنترل مهاری درد نقش دارند، این سیستم‌ها می‌توانند به‌عنوان هدف برای یافتن راهکارهای موثری برای درمان درد باشند [۴].

درد مزمن اسکلتی-عضلانی ناتوان‌کننده است، درمان آن دشوار بوده و هر دو جز التهابی و غیرالتهابی را شامل می‌شود [۶]. بیماری‌های خودایمنی (نظیر لوپوس)، عفونت‌ها، جراحی‌ها و بیماری‌های عصبی-عضلانی (مثل دیستروفی عضلانی) همگی می‌توانند سبب بروز دردهای عضلانی شوند [۷]. برای مطالعه در حیوانات آزمایشگاهی، از تزریق سالی‌ن هیپرتونیک، سالی‌ن اسیدی و فرمالین به عضلات اسکلتی یا ایجاد خستگی عضلانی برای القای دردهای عضلانی استفاده شده است و رفتارهای مربوط به درد مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند [۸].

در مطالعه حاضر، اثر تجویز خوراکی کوروکومین بر درد عضلانی ناشی از تزریق فرمالین در موش‌های صحرایی مورد ارزیابی قرار گرفته است. همچنین، برای بررسی نقش گیرنده‌های اپیوئیدی و کانابینوئیدی نوع ۱، از تزریق داخل بطن مغزی نالوکسان (آنتاگونیست غیراختصاصی گیرنده‌های اپیوئیدی) و آم‌۲۵۱ (آنتاگونیست گیرنده‌های کانابینوئیدی نوع ۱) پس از تجویز خوراکی کوروکومین و قبل از تزریق فرمالین استفاده شد. لازم به ذکر است که تا کنون اثر کوروکومین بر درد عضلانی فرمالینی و نقش گیرنده‌های مرکزی اپیوئیدی و کانابینوئیدی در اثرات ضد دردی این ماده بررسی نشده است.

<sup>2</sup> Periaqueductal gray

<sup>3</sup> AM251

<sup>4</sup> Dimethyl sulfoxide

کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند. سر حیوان در دستگاه استریوتاکسی (استئولتینگ، امریکا) قرار داده شد. پس از تراشیدن موها و ضدعفونی کردن محل شکافی به طول ۲ سانتیمتر در پوست سر داده شد. برای مشخص شدن برگما (محل تلاقی استخوان‌های آهیانه و پیشانی، نقطه مرجع) ضریح استخوان تراشیده شد و ناحیه جراحی با استفاده از قلاب در معرض دید قرار گرفت. سپس سوراخی به قطر ۱ میلی‌متر در مختصات زیر در استخوان جمجمه ایجاد گردید: ۱/۵ میلی‌متر خلف برگما، ۱/۵ میلی‌متر سمت راست خط میانی [۱۱]. کانول ضدزنگ استیل شماره ۲۳ به طول ۱۳ میلی‌متر تا عمق ۴ میلی‌متری از سطح افقی استخوان‌های سر در داخل بطن جانبی قرار داده شد. خروج مایع بی رنگ شفاف ضربان‌دار از سر کانول صحت محل کانول در داخل بطن جانبی مغز را تایید کرد. سه عدد پیچ ریز در استخوان‌های اطراف کانول قرار داده شده و در نهایت دور کانول و روی پیچ‌ها با خمیر دندانپزشکی پر شده و یک سیم ضد زنگ استیل هم قطر با قطر داخلی کانول و هم طول با کانول در داخل کانول قرار داده شد. پس از بخیه‌زدن پوست، ناحیه جراحی با پنی‌سیلین جی پتاسیم آغشته شده و به مدت ۲ روز به‌طور روزانه ۵۰۰۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم پنی‌سیلین به روش داخل صفاقی تزریق شد.

### روش‌های خوراندن کوکومین و تزریق به داخل بطن مغز

سوسپانسیون کوکومین در حجم ۱ میلی‌لیتر به ازای هر موش صحرایی به روش گاوآژ خورنده شد. برای تزریق سالین نرمال، نالوکسان و آم‌۲۵۱ به داخل بطن جانبی مغز از سرسوزن تزریقی شماره ۳۰ استفاده شد که با یک لوله پلی اتیلنی به سرنگ هامیلتون پنج‌میکرولیتری متصل شده بود. تجویز خوراکی کوکومین ۴۵ دقیقه و تزریق داخل بطنی نالوکسان و آم‌۲۵۱ پنج دقیقه قبل از تزریق داخل عضلانی فرمالین انجام گرفت. محلول‌های دارویی به داخل بطن جانبی مغز در حجم ۲ میکرولیتر و در مدت زمان ۴۰ ثانیه تزریق شدند و به‌منظور انتشار محلول دارویی در بطن جانبی مغز، ۴۰ ثانیه دیگر سر سوزن در داخل کانول ماند.

میلی‌گرم به کیلوگرم وزن بدن کوکومین به حیوان خورنده شد و ۴۵ دقیقه بعد فرمالین به عضله تزریق و سپس رفتار درد بررسی گردید.

در مرحله سوم، نقش سیستم اپیوئیدی مرکزی بر عملکرد کوکومین در رفتار درد ناشی از تزریق فرمالین به داخل عضله گاستروکنمیوس بررسی شد. در این مرحله ابتدا در ۳ گروه پس از خوراندن آب مقطر، اثر تزریق سالین نرمال و مقادیر ۰/۵ و ۲ میکروگرم به ازای هر موش صحرایی نالوکسان (آنتاگونیست غیر اختصاصی گیرنده‌های اپیوئیدی) پنج دقیقه قبل از تزریق داخل عضلانی فرمالین به روش داخل بطن مغزی بررسی شد. سپس در یک گروه ۴۵ دقیقه پس از خوراندن کوکومین (۱۰۰ میلی‌گرم به کیلوگرم وزن بدن) و پنج دقیقه پس از اثر تزریق داخل بطن مغزی نالوکسان (۲ میکروگرم به ازای هر موش صحرایی)، تزریق داخل عضلانی فرمالین انجام شد.

در مرحله چهارم، نقش سیستم کانابینوئیدی مرکزی بر عملکرد کوکومین در رفتار درد ناشی از تزریق فرمالین به داخل عضله گاستروکنمیوس بررسی شد. در این مرحله ابتدا در ۳ گروه پس از خوراندن آب مقطر، اثر تزریق دی‌متیل سولفوکساید پنج درصد و مقادیر ۰/۵ و ۲ میکروگرم به ازای هر موش صحرایی آم‌۲۵۱ (آنتاگونیست گیرنده‌های کانابینوئیدی نوع ۱) پنج دقیقه قبل از تزریق داخل عضلانی فرمالین به روش داخل بطن مغزی بررسی گردید. سپس در یک گروه ۴۵ و ۵ دقیقه قبل از تزریق داخل عضلانی فرمالین به ترتیب خوراندن کوکومین (۱۰۰ میلی‌گرم به کیلوگرم وزن بدن) و اثر تزریق داخل بطن مغزی آم‌۲۵۱ (۲ میکروگرم به ازای هر موش صحرایی) انجام شدند.

مقادیر کوکومین، نالوکسان و آم‌۲۵۱ براساس کارهای تحقیقاتی انجام شده [۹، ۱۰] و آزمایش‌های اولیه ما تعیین شدند.

### روش کانول‌گذاری در داخل بطن جانبی مغز

به‌منظور تزریق داخل بطن مغزی محلول‌های دارویی، با استفاده از جراحی استرنوتاکسی یک عدد کانول راهنمای ضد زنگ استیل در بطن جانبی هر یک از موش‌های صحرایی قرار داده شد. حیوانات با تزریق داخل صفاقی مخلوطی از کتامین (۸۰ میلی‌گرم به کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۸ میلی‌گرم به

## روش ایجاد و ثبت درد عضلانی

برای ایجاد و ثبت درد ناشی از تزریق فرمالین به داخل عضله گاستروکنیموس، موش‌ها در دستگاه ثبت درد فرمالینی قرار داده شدند. دستگاه مذکور جعبه‌هایی از جنس شیشه نشکن (شرکت حصارک رازی راد، تهران) به ابعاد  $25 \times 25 \times 25$  سانتی‌متر می‌باشد که بر روی چهارچوب‌هایی از جنس شیشه نشکن و دارای یک آینه با زاویه  $45^\circ$  درجه قرار می‌گیرند. نیم ساعت پس از سازگاری، حیوان به آرامی مقید شد و به‌وسیله سر سوزن شماره ۳۰، حجم ۵۰ میکرولیتر از محلول فرمالین با غلظت  $2/5$  درصد به عضله گاستروکنیموس تزریق گردید. بلافاصله پس از تزریق حیوان به داخل جعبه برگردانده شد و پاسخ‌های حیوان شامل مدت زمان لیسیدن و گاز گرفتن پای خلفی و تعداد لرزش پای تزریق شده در فواصل زمانی پنج دقیقه‌ای برای مدت یک ساعت ثبت شدند.

## روش ثبت فعالیت حرکتی

آزمون فعالیت حرکتی با استفاده از جعبه فعالیت پرتو نور<sup>۵</sup> (برج صنعت تهران، ایران) انجام شد. دستگاه مذکور شامل یک پلکسی گلاس ( $40 \times 40 \times 40$ ) است که هنگام حرکت حیوان نمایشگر دستگاه تعداد شکست پرتوهای نور را نشان می‌دهد. منظور ارزیابی فعالیت حرکتی، داروهای مورد استفاده با فاصله‌های زمانی ذکر شده تجویز شدند و سپس هر حیوان به‌طور جداگانه در یک گوشه از این جعبه قرار گرفت. میزان فعالیت حرکتی حیوان در پنج دقیقه ثبت شد.

## تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار گراف پد پرسم نسخه ۶۸ استفاده گردید. داده‌های حاصل از واردکردن به‌تنهایی سرسوزن، تزریق سالی‌ن نرمال و فرمالین به عضله به‌منظور تعیین الگوی درد، با روش آماری آنالیز واریانس (ANOVA) دوطرفه<sup>۶</sup> و سپس آزمون تعقیبی بنفرونی<sup>۷</sup> و داده‌های حاصل از تجویز خوراکی کوروکومین به‌تنهایی و همراه با تزریق داخل بطنی سالی‌ن نرمال (کنترل) و محلول‌های دارویی با روش

آماري آنالیز واریانس (ANOVA) یک‌طرفه<sup>۹</sup> و سپس آزمون توکی<sup>۱۰</sup> تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌دار،  $p < 0/05$  در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

### تایید محل کانول گذاری

تصویر ۱ محل قرارگیری کانول راهنما در بطن جانبی را به‌صورت ترسیمی، که از اطلس مغز موش صحرایی [۱۱] اقتباس شده است، نشان می‌دهد.

### رفتارهای درد به‌دنبال تزریق داخل عضلانی فرمالین

نمودار ۱ منحنی‌های مربوط به پاسخ درد پس از وارد کردن سر سوزن تزریقی و تزریق داخل عضلانی سالی‌ن نرمال و فرمالین  $2/5$  درصد به عضله گاستروکنیموس در بازه‌های زمانی پنج دقیقه‌ای را نشان می‌دهد. مدت زمان لیسیدن پای خلفی متعاقب واردکردن به‌تنهایی سر سوزن و تزریق داخل عضلانی سالی‌ن نرمال به ترتیب  $0/34 \pm 0/5$  و  $0/54 \pm 0/83$  ثانیه فقط در پنج دقیقه اول به دست آمد. تعداد لرزش‌های پای خلفی پس از وارد کردن به‌تنهایی سر سوزن و تزریق داخل عضلانی سالی‌ن نرمال به ترتیب  $0/23 \pm 1/5$  و  $2/0 \pm 0/27$  فقط در پنج دقیقه اول مشاهده شد. متعاقب تزریق داخل عضلانی فرمالین مدت زمان لیسیدن پای خلفی در پنج دقیقه‌های اول و ششم تا هشتم نسبت به پنج دقیقه‌های دوم، سوم، چهارم، پنجم، نهم، دهم، یازدهم و دوازدهم افزایش معنی‌دار ( $p < 0/001$ ) نشان داد. به‌عبارت‌دیگر به‌دنبال تزریق داخل عضلانی فرمالین پاسخ درد لیسیدن به صورت دو مرحله‌ای ایجاد شد (مرحله اول: دقایق صفر تا پنج و مرحله دوم: دقایق ۳۱ تا ۴۰). از طرف دیگر، تعداد لرزش‌های پای خلفی در پنج دقیقه‌های اول و پنجم تا نهم نسبت به پنج دقیقه‌های دوم، سوم، چهارم، دهم، یازدهم و دوازدهم افزایش معنی‌دار ( $p < 0/001$ ) نشان داد. به‌عبارت‌دیگر به‌دنبال تزریق عضلانی فرمالین پاسخ درد مربوط به لرزش‌های پا به صورت دو مرحله‌ای ایجاد شد (مرحله اول: دقایق صفر تا پنج و مرحله دوم: دقایق ۲۶ تا ۴۵).

<sup>5</sup> Photobeam activity box

<sup>6</sup> Graph pad prism version 8

<sup>7</sup> Two-way analysis of variance (ANOVA)

<sup>8</sup> Bonferroni post hoc test

<sup>9</sup> One-way analysis of variance (ANOVA)

<sup>10</sup> Tuckey post hoc test



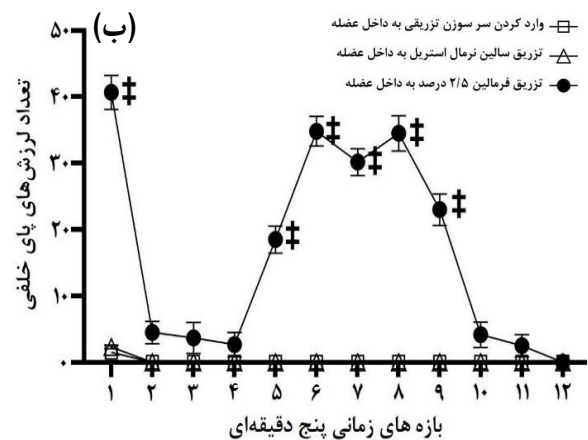
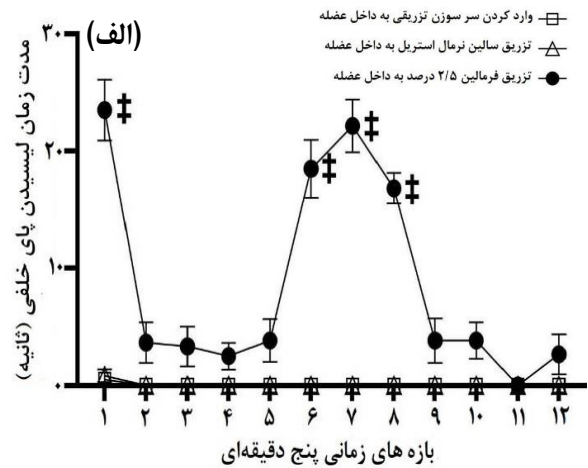
## فعالیت حرکتی به دنبال خوراندن کورکومین و تزریق داخل بطن مغزی نالوکسان و آم ۲۵۱

تعداد شکست پرتوهای نور در گروه دریافت‌کننده سالیین نرمال  $6/50 \pm 98/66$  در ۵ دقیقه بود. تجویز خوراکی کورکومین، حامل کورکومین و تزریق داخل بطنی داروها و نیز تجویز توام داروها در مقایسه با گروه دریافت‌کننده سالیین نرمال تغییر معنی‌داری در تعداد قطع اشعه در جعبه فعالیت پرتو نور ایجاد نکردند ( $p > 0/05$ ، نمودار ۵).

### بحث

در این مطالعه تزریق فرمالین به عضله گاستروکنیموس موش صحرایی یک رفتار دو مرحله‌ای مشخص درد ایجاد کرد که این پاسخ‌های رفتاری شامل لیسیدن و لرزش‌های پای تزریق شده بودند. وارد کردن سر سوزن تزریقی و تزریق سالیین نرمال استریل به داخل عضله گاستروکنیموس پاسخ‌های رفتاری درد قابل توجهی ایجاد نکردند. از آزمون درد فرمالینی مکرراً برای بررسی مکانیسم‌های درد در مطالعات استفاده شده است. رفتارهای درد به دنبال تزریق فرمالین به کف پا به صورت لیسیدن، گاز گرفتن، بلند کردن، و لرزش‌های پای تزریق شده به صورت دو مرحله‌ای گزارش شده است و پردازش‌های رفلکسی لرزش‌های پا به سطح نخاعی و لیسیدن و گازگرفتن ناحیه تزریق شده به سطح فوق نخاعی نسبت داده شده اند [۱۲]. رفتارهای درد دو مرحله‌ای مشابهی متعاقب تزریق فرمالین ۲/۵ درصد به عضله گاستروکنیموس موش‌های صحرایی نیز گزارش شده است [۱۳]. مرحله اول (مرحله نوروژنیک<sup>۱۱</sup>) ناشی از تحریک مستقیم گیرنده‌های درد توسط فرمالین می‌باشد و مرحله دوم (مرحله التهابی) به علت آزاد شدن واسطه‌های التهابی بروز می‌کند [۱۴].

در مطالعه حاضر، تجویز خوراکی کورکومین پاسخ‌های درد را در هر دو مرحله اول و دوم درد عضلانی ناشی از تزریق فرمالین کاهش داد. کورکومین مکانیسم‌های مختلف ایجادکننده درد را تحت تاثیر قرار می‌دهد [۳]. برای مثال، در مدل درد دهانی صورتی<sup>۱۲</sup> ناشی از تزریق فرمالین به لب بالا، علاوه از ایجاد اثرات ضد دردی در مراحل اول و دوم، کورکومین دامنه جریان‌های الکتریکی کانال‌های یونی حساس

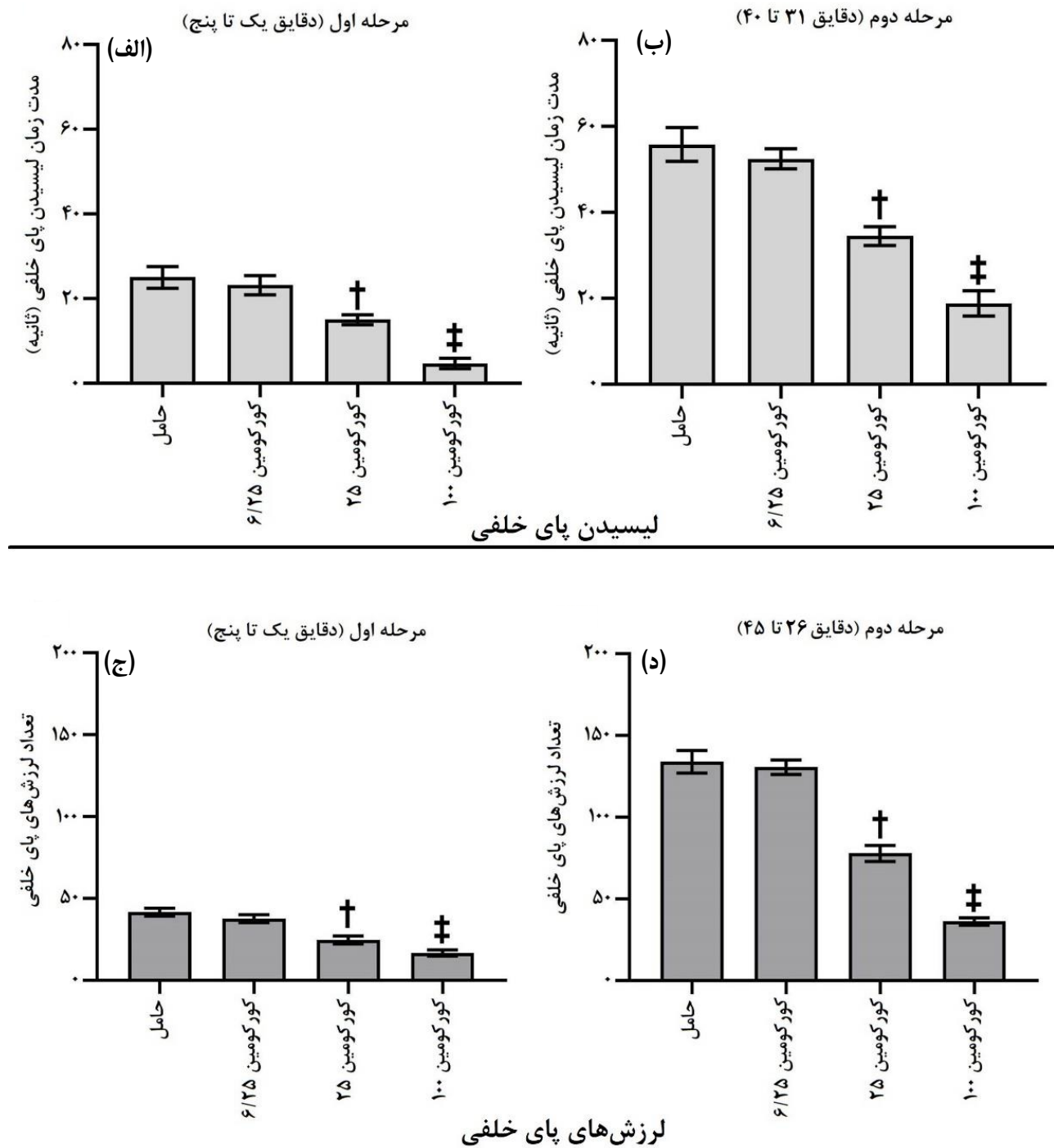


**نمودار ۱-** پاسخ‌های درد شامل لیسیدن پنجه پا (الف) و تعداد لرزش‌های پا (ب) در حیوانات به دنبال وارد کردن سر سوزن تزریقی و تزریق سالیین نرمال و فرمالین به داخل عضله گاستروکنیموس در موش‌های صحرایی. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین نمایش داده شده‌اند. تعداد حیوان در هر گروه شش سر موش صحرایی بود.  $\ddagger$ : اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0/001$  با پنج دقیقه‌های دوم تا پنجم و نهم تا دوازدهم را در نمودارهای الف نشان می‌دهد.  $\ddagger$ : اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0/001$  با پنج دقیقه‌های دوم تا چهارم و دهم تا دوازدهم را در نمودار ب نشان می‌دهد.

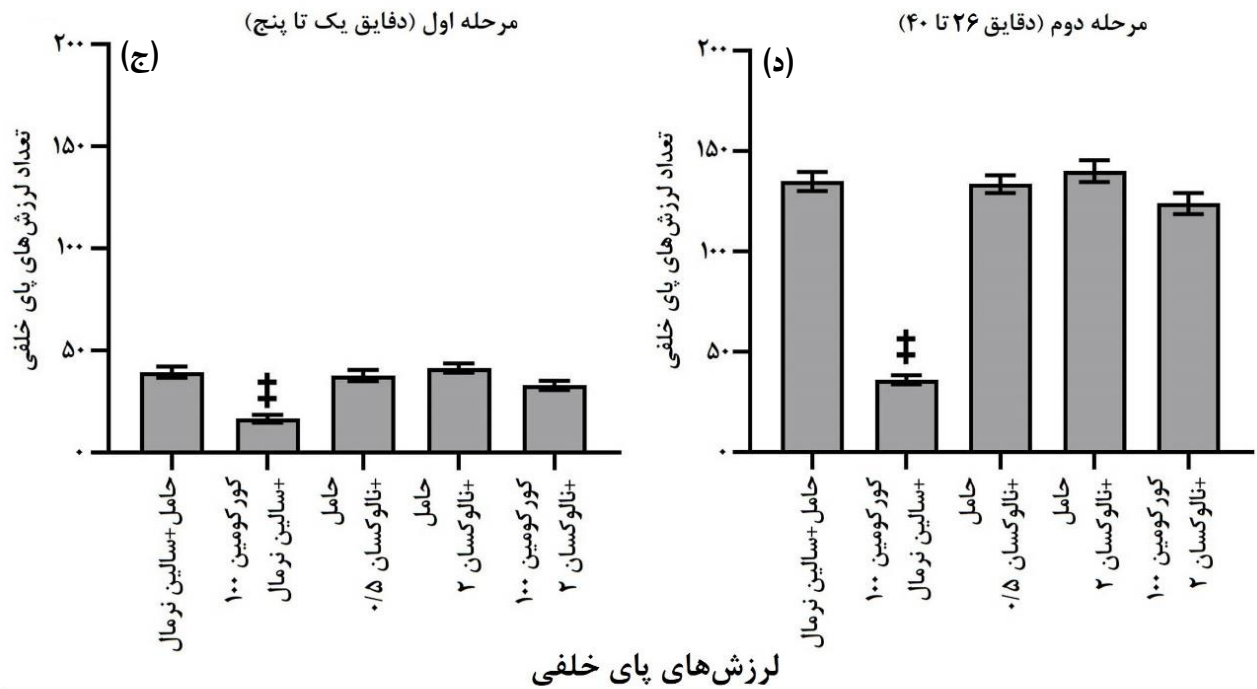
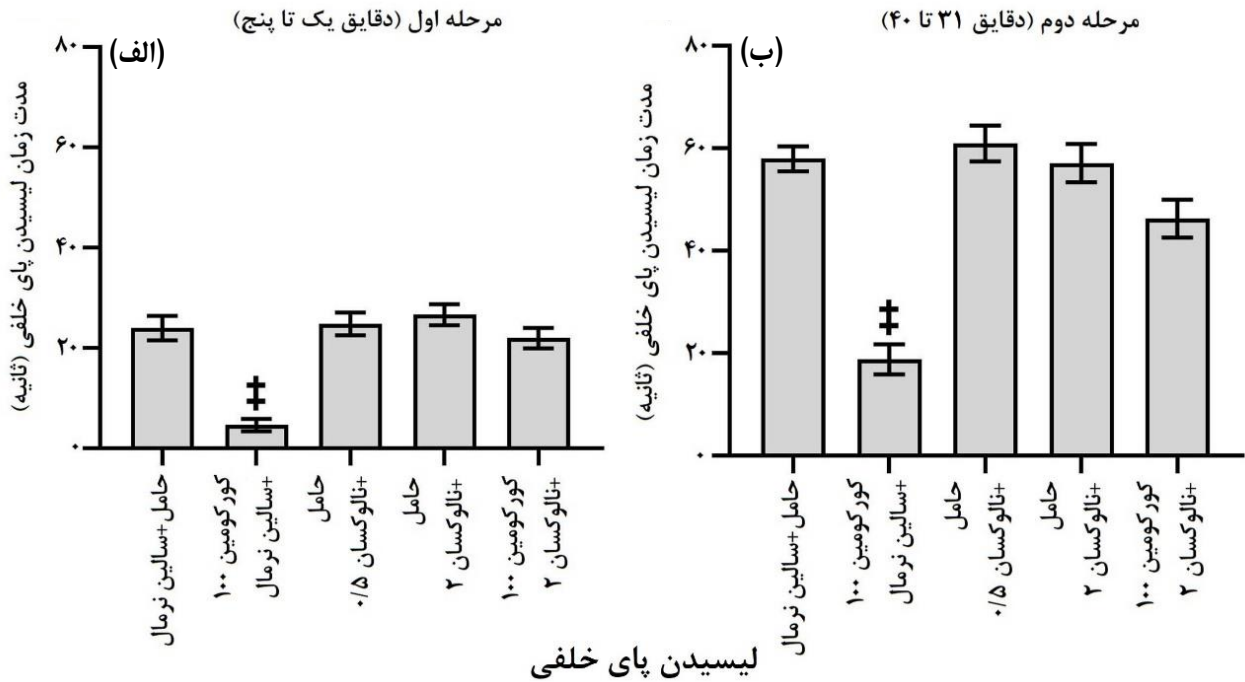
آم ۲۵۱ (۲ میکروگرم به ازای هر موش صحرایی) پس از تجویز خوراکی کورکومین با مقدار ۱۰۰ میلی گرم به کیلوگرم وزن بدن و قبل از تزریق فرمالین، از اثرات ضد دردی ایجاد شده توسط کورکومین در مرحله اول ( $p < 0/001$ ) و  $F(4,25) = 20/94$  و مرحله دوم ( $p < 0/001$ ) و  $F(4,25) = 41/74$  لیسیدن پا و همچنین مرحله اول ( $p < 0/001$ ) و  $F(4,25) = 19/77$  و مرحله دوم ( $p < 0/001$ ) و  $F(4,25) = 87/80$  لرزش‌های پا جلوگیری کرد.

<sup>11</sup> Neurogenic phase

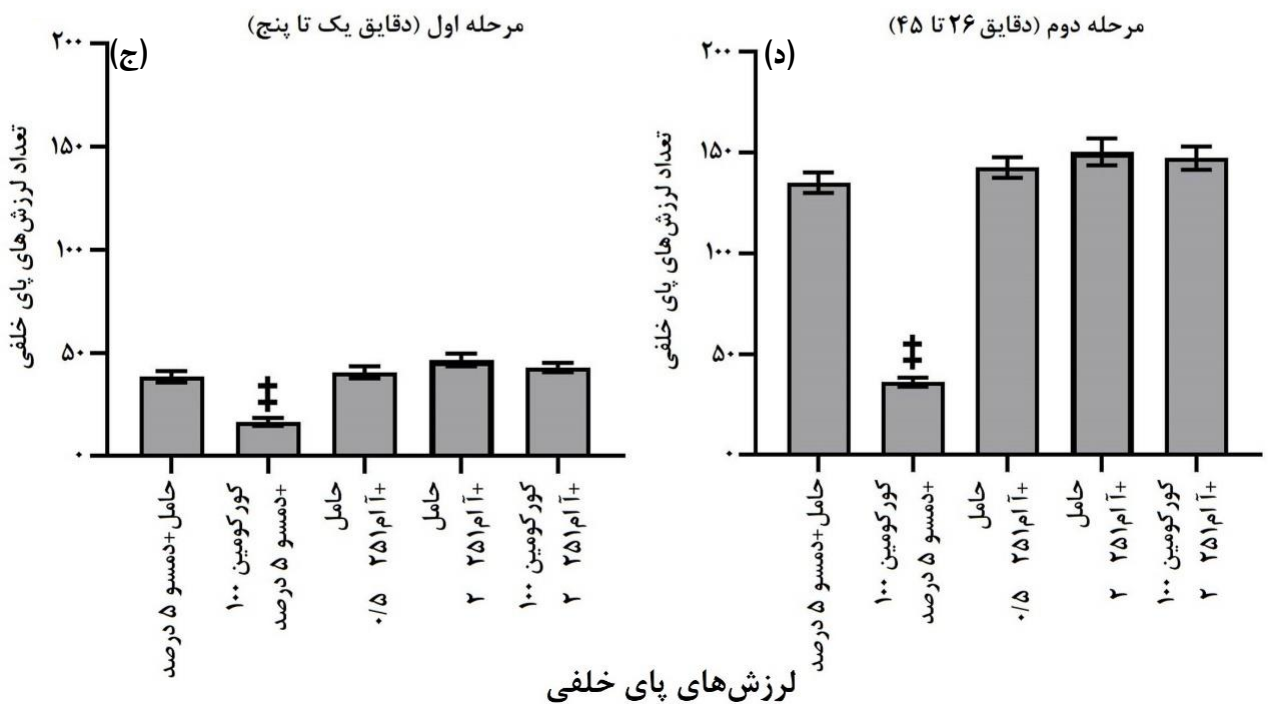
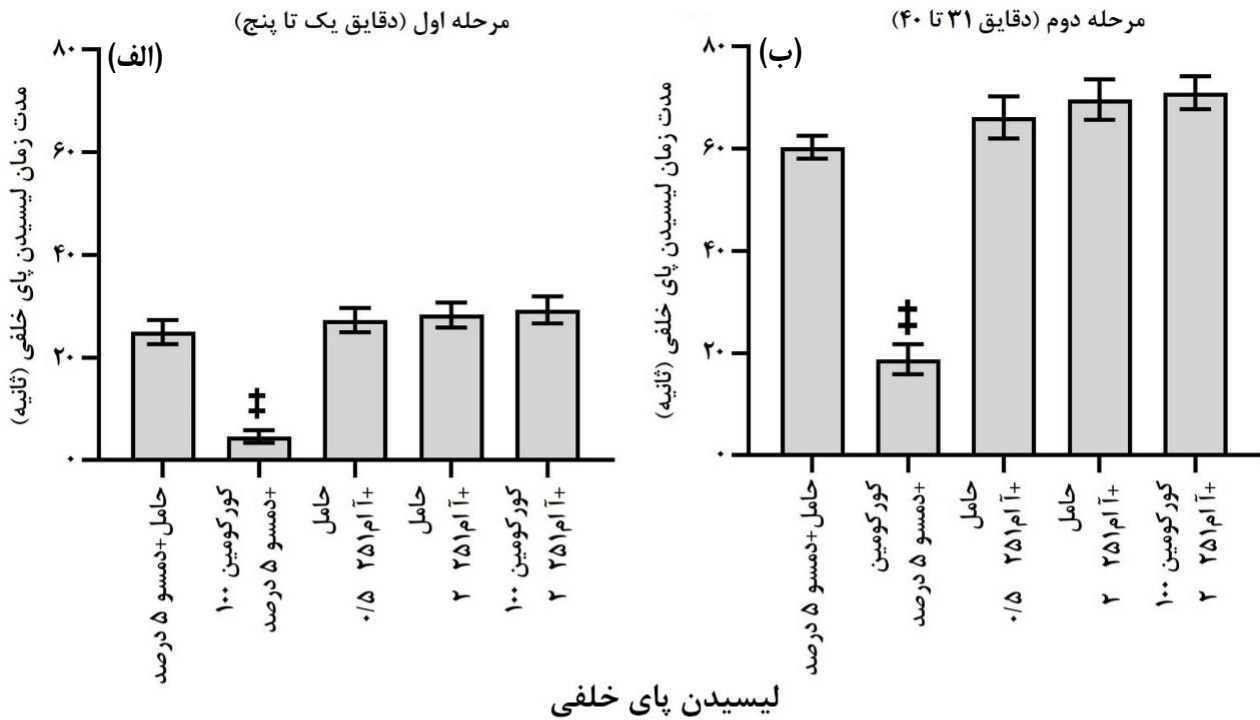
<sup>12</sup> Orofacial pain



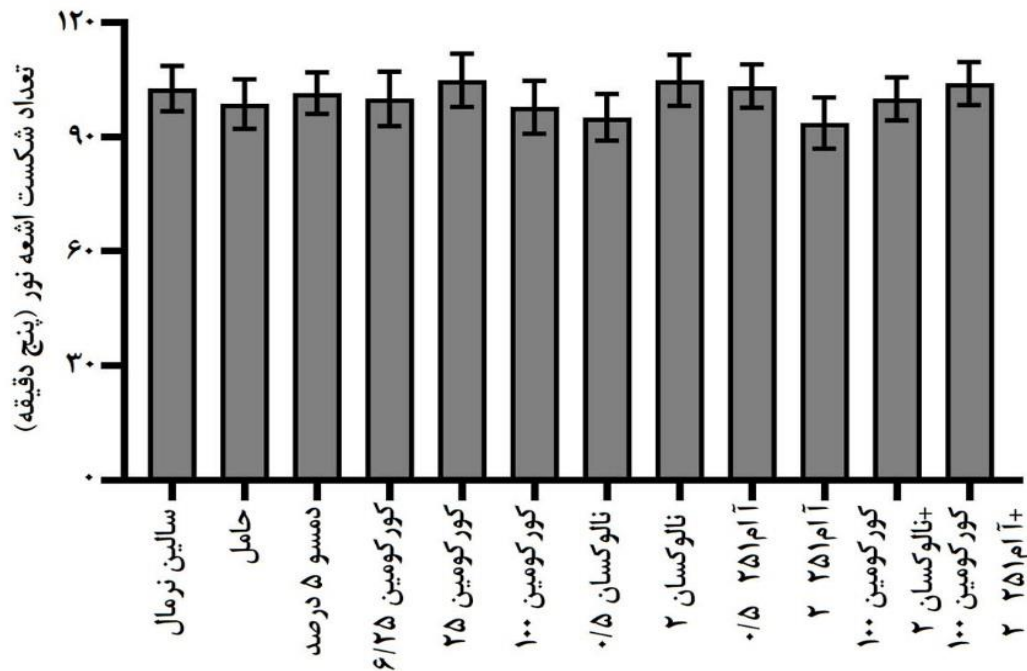
**نمودار ۲-** اثر تجویز خوراکی کورکومین بر پاسخ‌های درد شامل لیسیدن پای خلفی در مرحله اول (الف) و مرحله دوم (ب) و لرزش‌های پای خلفی در مرحله اول (ج) و مرحله دوم (د) به‌دنبال تزریق فرمالین به عضله گاستروکنیموس در موش‌های صحرایی. حامل، کورکومین (۶/۲۵ و ۲۵ میلی‌گرم به کیلوگرم وزن بدن) ۴۵ دقیقه قبل از تزریق داخل عضلانی فرمالین به روش گاواژ خورنده شدند. داده‌های نمودارها به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین نمایش داده شده است. تعداد حیوان در هر گروه شش سر موش صحرایی بود. †: اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.05$  با گروه حامل را نشان می‌دهد. ‡: اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.01$  با گروه حامل را نشان می‌دهد.



**نمودار ۳-** اثر تزریق نالوکسان به بطن جانبی مغز پس از تجویز خوراکی حامل کور کومین و کور کومین (۱۰۰ میکروگرم) بر پاسخ‌های درد شامل لیسیدن پای خلفی در مرحله اول (الف) و دوم (ب) و لرزش‌های پای خلفی در مرحله اول (ج) و دوم (د) ناشی از تزریق فرمالین به عضله گاستروکیموس در موش‌های صحرائی. خوراندن حامل، کور کومین (۱۰۰ میلی‌گرم به کیلوگرم وزن بدن) به روش گاواژ ۴۵ دقیقه و تزریق داخل بطن مغزی نالوکسان (۰/۵ و ۲ میکروگرم) پنج دقیقه قبل از تزریق داخل عضلانی فرمالین انجام شدند. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین نمایش داده شده است. تعداد حیوان در هر گروه شش سر موش صحرائی بود. †: اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0/001$  با بقیه گروه‌ها را نشان می‌دهد.



**نمودار ۴-** اثر تزریق آم ۲۵۱ به بطن جانبی مغز پس از تجویز خوراکی حامل کور کومین و کور کومین (۱۰۰ میکروگرم) بر پاسخ‌های درد شامل لیسیدن پای خلفی در مرحله اول (الف) و دوم (ب) و لرزش‌های پای خلفی در مرحله اول (ج) و دوم (د) ناشی از تزریق فرمالین به عضله گاستروکنیموس در موش‌های صحرائی. خوراندن حامل، کور کومین (۱۰۰ میلی‌گرم به کیلوگرم وزن بدن) به روش گاواژ ۴۵ دقیقه و تزریق داخل بطن مغزی آم ۲۵۱ (۰/۵ و ۲ میکروگرم) پنج دقیقه قبل از تزریق داخل عضلانی فرمالین انجام شدند. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین نمایش داده شده است. تعداد حیوان در هر گروه شش سر موش صحرائی بود.  $\ddagger$ : اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0/001$  با بقیه گروه‌ها را نشان می‌دهد.



**نمودار ۵-** اثر تزریقات داروها بر تعداد شکست اشعه نور به دنبال حرکت موش‌های صحرایی در جعبه فعالیت پرتو نور. داده‌های بدست‌آمده از شش سر موش صحرایی در هر گروه. خوراندن حامل، کورکومین (۶/۲۵، ۲۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم به کیلوگرم وزن بدن) به روش گاواژ ۴۵ دقیقه و تزریق داخل بطن مغزی نالوکسان (۰/۵ و ۲ میکروگرم) و آآ ۲۵۱م (۰/۵ و ۲ میکروگرم) پنج دقیقه قبل از تزریق داخل عضلانی فرمالین انجام شدند. در نمودارها به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین نشان داده شده‌اند. بین گروه‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ).

غلظت سیتوکین‌های التهابی را در عضله اسکلتی پس از ورزش کاهش داده است [۱۷]. به علاوه، در دردهای عضلانی تاخیری پس از ورزش<sup>۱۷</sup> کورکومین اثر تخفیف‌دهندگی ایجاد کرده و باعث کاهش سطوح سرمی کراتین کیناز شده است [۱۸].

در مطالعه حاضر تزریق نالوکسان به بطن جانبی پس از تجویز خوراکی حامل کورکومین، اثری بر پاسخ‌های درد ایجادشده توسط تزریق فرمالین به عضله نداشت. با این وجود، تزریق نالوکسان به بطن جانبی از اثر ضددردی درد ناشی از تجویز حاد یا طولانی مدت کورکومین بر درد قرینه‌ای حاد را مهار کند [۱۰]. تزریق موضعی نالوکسان، کلوسیناموکس<sup>۱۸</sup> (آتاگونست اختصاصی گیرنده‌های مو)، نالتریندول<sup>۱۹</sup> (آتاگونست اختصاصی گیرنده‌های دلتا) و نور-بینالتورفیمین<sup>۲۰</sup> (آتاگونست اختصاصی گیرنده‌های کاپا) به تنهایی بر شدت

به اسید<sup>۱۳</sup> را در نورون‌های عقده سه قلو<sup>۱۴</sup> کاهش داد [۱۵]. به علاوه، در مدل درد القا شده با تزریق کف پای فرمالین، اثرات کاهندگی کورکومین بر مراحل اول و دوم آن توسط گلی بن کلامید<sup>۱۵</sup>، مهارکننده کانال‌های پتاسیمی وابسته به آتی‌پی<sup>۱۶</sup> مهار شد که نشان می‌دهد کورکومین با تغییر نفوذپذیری کانال‌های پتاسیمی می‌تواند شدت درد را تغییر بدهد [۱۶]. از اثر مستقیم کورکومین در ساختارهای فوق نخاعی درگیر در پردازش مکانیسم‌های درد گزارشی ارائه نشده است، ولی چون کورکومین به راحتی از سدخونی مغزی عبور کرده و توسط مایع مغزی نخاعی در همه ساختمان‌های مغزی منتشر می‌شود [۵]، این احتمال وجود دارد که بخشی از اثرات ضددردی کورکومین به علت اثر بر ساختارهای مذکور باشد. اگرچه اثر کورکومین در پردازش موضعی، نخاعی و فوق نخاعی درد ناشی از تزریق فرمالین به عضله مورد بررسی قرار نگرفته است، کورکومین

<sup>17</sup> Exercise-induced muscle damage and delayed-onset muscle soreness

<sup>18</sup> Clocinnamox

<sup>19</sup> Naltrindole

<sup>20</sup> Nor-binaltorphimine

<sup>13</sup> Acid-sensing ion channels

<sup>14</sup> Trigeminal ganglion

<sup>15</sup> Glibenclamide

<sup>16</sup> ATP-dependent K<sup>+</sup> channels inhibitor

می‌دهد گیرنده‌های کانابینوئیدی می‌توانند عملکرد موضعی کورکومین در درد را پردازش کنند [۱۹]. با این وجود، درباره نقش گیرنده‌های کانابینوئیدی در سطوح نخاعی و فوق‌نخاعی در اثر ضد درد کورکومین بر درد عضلانی مطالعه‌ای صورت نگرفته است.

در مطالعه حاضر، تجویز به‌تنهایی و یا توأم کورکومین، نالوکسان و آ‌ام ۲۵۱ اختلالی در فعالیت حرکتی به علت آرام‌بخشی (کاهش فعالیت) و یا حساس‌شدن (افزایش فعالیت) ایجاد نکردند. بیشتر، اما نه همگی داروهای ضد درد ممکن است تا حدودی، به دلیل کاهش یا افزایش فعالیت حرکتی، رفتار درد را تحت تأثیر قرار بدهند و در نتیجه، پاسخ‌های درد ممکن است صرفاً به دلیل اثر ضد درد این داروها نباشد. بنابراین، رفتار حرکتی باید در کنار رفتار درد ارزیابی شود [۲۴]. در همین رابطه گزارش شده است که تزریق داخل‌نخاعی کورکومین بدون اثر بر فعالیت حرکتی، رفتار درد را در مدل کف پایی درد فرمالینی کاهش می‌دهد [۲۵]. به علاوه، در مطالعه مربوط به بررسی اثر ضد درد ویتامین ث، تزریق داخل بطن مغزی نالوکسان و آ‌ام ۲۵۱ فعالیت حرکتی را تحت تأثیر قرار ندادند [۹].

### نتیجه‌گیری

کورکومین یک ماده با اثرات ضد درد و ضد التهابی بالا است که مکانیسم‌های مختلفی برای ایجاد اثر ضد درد به خدمت می‌گیرد؛ با این وجود، مکانیسم مرکزی ایجاد کننده بی‌دردی توسط کورکومین هنوز به‌طور دقیق مشخص نیست. در مطالعه حاضر مشاهده شد کورکومین احتمالاً با اثر بر مراکز تعدیل درد در سیستم عصبی مرکزی می‌تواند در درد عضلانی اثر تخفیف‌دهندگی داشته باشد و احتمالاً گیرنده‌های اپیوئیدی و کانابینوئیدی مرکزی در این اثر نقش دارند. شناخت مکانیسم‌های درگیر در اثر ضد درد مواد موثر گیاهان دارویی به یافتن داروهایی موثرتر برای بهبود روش‌های مدیریت درد بسیار سودمند هستند.

### سپاسگزاری

از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه تقدیر و تشکر می‌گردد.

درد ناشی از تزریق کف پای کاراگینان<sup>۲۱</sup> اثر نگذاشتند، ولی اثر ضد درد ناشی از تزریق کف پای کورکومین را مهار کردند که نشان می‌دهد هر سه نوع گیرنده اپیوئیدی در عملکرد ضد درد موضعی کورکومین می‌توانند نقش داشته باشند [۱۹]. در مطالعه‌ای دیگر در موش سفید کوچک آزمایشگاهی، درد استخوان ناشی از سرطان توسط کورکومین تخفیف یافته است و این اثر توسط تزریق محیطی نالوکسان مهار شده است [۲۰]. نقش گیرنده‌های اپیوئیدی در عملکرد ضد درد عصاره گیاهان دارویی نیز بررسی شده است. به‌عنوان مثال تجویز سیستمیک نالوکسان از اثر کاهندگی درد حاصل از عصاره الکلی گیاه سلوسیا کریستاتا<sup>۲۲</sup> در مدل‌های درد احشایی اسید استیکی و پیکری فرمالینی جلوگیری کرده است [۲۱]. در مدل درد فرمالینی کف پای، نالوکسانازین<sup>۲۳</sup> (آنتاگونیست اختصاصی گیرنده‌های مو) کاهش مرحله دوم درد حاصل از خوردن اسانس گیاه تیموس پرسیکوس<sup>۲۴</sup> را مهار کرده است [۲۲]. تا به حال گزارشی مبنی بر نقش موضعی، نخاعی و فوق‌نخاعی گیرنده‌های اپیوئیدی در عملکرد کاهش دهنده‌ی درد عضلانی کورکومین ارائه نشده است.

در مطالعه حاضر تزریق داخل بطن مغزی آ‌ام ۲۵۱ توانست اثر ضد درد ایجاد شده توسط تجویز خوراکی کورکومین را مهار کند. در مطالعات متعددی، برای بررسی مشارکت گیرنده‌های کانابینوئیدی نوع ۱ از آ‌ام ۲۵۱، آنتاگونیست گیرنده‌های مذکور، استفاده شده است [۱۹، ۹]. دو نوع گیرنده کانابینوئیدی مهم، گیرنده‌های نوع ۱ و نوع ۲ هستند که گیرنده‌های نوع ۱ عمدتاً در سیستم عصبی مرکزی و گیرنده‌های نوع ۲ بیشتر در خارج از سیستم عصبی مرکزی یافت می‌شوند و فعال شدن هر دو نوع گیرنده می‌تواند اثرات ضد درد را در موقعیت‌های مختلف ایجاد کند [۲۳]. تزریق موضعی آ‌ام ۲۵۶۳۰ (آنتاگونیست گیرنده‌های کانابینوئیدی نوع ۲) اثر ضد درد کورکومین در مدل درد ناشی از تزریق کف پای کاراگینان را معکوس کردند و وی‌دی‌ام ۲۶۱۱ (مهارکننده بازجذب آناندامید<sup>۲۷</sup>) اثر کورکومین را تقویت کرد که نشان

<sup>21</sup> Carrageenan

<sup>22</sup> *Celosia cristata*

<sup>23</sup> Naloxonazine

<sup>24</sup> *Thymus persicus*

<sup>25</sup> AM631

<sup>26</sup> VDM11

<sup>27</sup> Anadamide reuptake inhibitor

## ملاحظات مالی

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه (پژوهانه شماره ۱۴۰۰-۰۵-۱۳/۱۳-۱۰-۴۹۳) انجام شده است.

## تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

## نقش نویسندگان

ا.ت.: ایده و طراحی مطالعه، نظارت بر انجام مطالعه، آنالیز داده‌ها و نگارش مقاله؛ ا.ع.: انجام مطالعه و جمع‌آوری داده‌ها و نگارش مقاله؛ ن.ن.: انجام مطالعه و جمع‌آوری داده‌ها، اصلاح مقاله؛ ف.س.: انجام مطالعه و تایید محل کنول در داخل بطن جانبی مغز و جمع‌آوری داده‌ها و اصلاح مقاله.

## فهرست منابع

- coordinates. 6th ed. New York: Elsevier, Academic Press, 2007.
- [12] Asgharieh-Ahari M, Tamaddonfard E, Erfanparast A, Soltanalinejad-Taghiabad F, Histamine and its H1 receptors in the ventral pallidum mediate formalin-induced pain-related behaviors through this region and spinal cord opioid receptors. *Behav Pharmacol* 10 (2023) 1097
- [13] Tamaddonfard E, Tamaddonfard S, Cheraghiyan S, Effects of intracerebroventricular injection of vitamin B12 on formalin-induced muscle pain in rats: Role of cyclooxygenase pathway and opioid receptors. *Vet Res Forum* 9 (2018) 329-335.
- [14] Porro CA, Cavazzuti M, Spatial and temporal aspects of spinal and brain stem activation in the formalin pain model. *Prog Neurobiol* 41 (1993) 565-607.
- [15] Wu Y, Qin D, Yang H, Fu H, Evidence for the participation of acid-sensing ion channels (ASICs) in the antinociceptive effect of curcumin in a formalin-induced orofacial inflammatory model. *Cell Mol Neurobiol* 37 (2017) 635-642.
- [16] De Paz-Campos MA, Chávez-Piña AE, Ortiz MI, Castañeda-Hernández G, Evidence for the participation of ATP-sensitive potassium channels in the antinociceptive effect of curcumin. *Korean J Pain* 25 (2012) 221-227.
- [17] Jäger R, Caldwell AR, Sanders E, Mitchell JB, Rogers J, Purpura M, Oliver JM, Curcumin reduces muscle damage and soreness following muscle-damaging exercise. *Faseb J* 31 (2017) lb766-lb766.
- [18] Fang W, Nasir Y, The effect of curcumin supplementation on recovery following exercise-induced muscle damage and delayed-onset muscle soreness: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Phytother Res* 35 (2021) 1768-1781.
- [19] Aguiar DD, Gonzaga ACR, Teófilo ALH, Miranda FA, de Castro Perez A, Duarte IDG, Romero TRL, Curcumin induces peripheral antinociception by opioidergic and cannabinoidergic mechanism: Pharmacological evidence. *Life Sci* 293 (2022) 120279.
- [20] Zhao G, Shi Y, Gong C, Liu T, Nan W, Ma L, Wu Z, Da C, Zhou K, Zhang H, Curcumin exerts antinociceptive effects in cancer-induced bone pain via an endogenous opioid mechanism. *Front Neurosci* 15 (2021) 696861.
- [21] Islam S, Shajib Md S, Ahmed T, Antinociceptive effect of methanol extract of *Celosia cristata* Linn. in mice. *BMC Complement Altern Med* 16 (2016) 400.
- [1] Rogozea L, Dinu EA, Constantin D, Leășu FG, Self-medicating for pain: A public health perspective. *Am J Ther* 27 (2020) e387-e391.
- [2] Carter GT, Duong, V, Ho S, Ngo KC, Greer CL, Weeks DL, Side effects of commonly prescribed analgesic medications. *Phys Med Rehabil Clin* 25 (2014) 457-470.
- [3] Razavi BM, Ghasemzadeh Rahbardar M, Hosseinzadeh H, A review of therapeutic potentials of turmeric (*Curcuma longa*) and its active constituent, curcumin, on inflammatory disorders, pain, and their related patents. *Phytother Res* 35 (2021) 6489-6513.
- [4] Tsagareli N, Tsiklauri N, Kvachadze I, Tsagareli, MG, Endogenous opioid and cannabinoid systems contribute to antinociception produced by administration of NSAIDs into the insular cortex of rats. *Biomed Pharmacother* 131 (2020) 110722.
- [5] Wilson-Poe AR, Morgan MM, Aicher SA, Hegarty DM, Distribution of CB1 cannabinoid receptors and their relationship with mu-opioid receptors in the rat periaqueductal gray. *Neuroscience* 213 (2012) 191-200.
- [6] Sluka KA, Radhakrishnan R, Benson CJ, Eshcol JO, Price MP, Babinski K, Audette KM, Yeomans DC, Wilson SP, ASIC3 in muscle mediates mechanical, but not heat, hyperalgesia associated with muscle inflammation. *Pain* 129 (2007) 102-112.
- [7] Mathews KD, Stephan CM, Laubenthal K, Winder TL, Michele DE, Moore SA, Campbell K, Myoglobinuria and muscle pain are common in patients with limb-girdle muscular dystrophy 2I. *Neurology* 76 (2011) 194-195.
- [8] DeSantana JM, da Cruz KM, Sluka KA, Animal models of fibromyalgia. *Arthritis Res Ther* 15 (2013) 1-13.
- [9] Erfanparast A, Tamaddonfard E, Tamaddonfard S, Esmaeilou Y, Daneshyar R, Raissian D, Opioid and CB1 receptor involvement in central anti-nociceptive effect of vitamin C in the formalin-induced pain model in rats. *Iran J Physiol Pharmacol* 5 (2022) 223-232.
- [10] Tamaddonfard E, Hamzeh GF, Hamzeh GN, Effect of curcumin on morphine-induced antinociception in acute corneal pain in rats. *Int J Vet Sci Res*, 4 (2010) 127-131.
- [11] Paxinos G, Watson C, The rat brain in stereotaxic

- [22] Abed DZ, Sadeghian R, Mohammadi S, Akram M, *Thymus persicus* (Ronniger ex Rech. f.) Jalas alleviates nociceptive and neuropathic pain behavior in mice: Multiple mechanisms of action. *J Ethnopharmacol* 283 (2022) 114695.
- [23] Anthony AT, Rahmat S, Sangle P, Sandhu O, Khan S, Cannabinoid receptors and their relationship with chronic pain: a narrative review. *Cureus* 12 (2020) e10436
- [24] Cortright DN, Matson DJ, Broom DC, New frontiers in assessing pain and analgesia in laboratory animals. *Expert Opin Drug Discov* 9 (2008) 1099-1108.
- [25] Han YK, Lee SH, Jeong HJ, Kim MS, Yoon MH, Kim WM, Analgesic effects of intrathecal curcumin in the rat formalin test. *Korean J Pain* 25 (2012) 1-6.

## Research paper

## The role of central opioid and CB1 cannabinoid receptors in the antinociceptive effect of curcumin on the formalin-induced muscle pain in rats

Nabat Naqshbandi, Esmaeel Tamaddonfard\*, Amir Erfanparast, Farhad Soltanolinejad-Taghiabad

Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 25 June 2023

Accepted: 24 July 2023

## Abstract

**Background and aim:** Curcumin, the biologically active ingredient of turmeric (*Curcuma longa*), affects pain processing at different levels. Local mechanisms of action of curcumin are somewhat known, but the central effects at the spinal and supraspinal levels have been less investigated. In this study, the effect of oral administration of curcumin on the formalin-induced muscle pain was investigated. In addition, naloxone (a non-selective opioid receptor antagonist) and AM251 (a cannabinoid 1 receptor antagonist) were used to clarify the possible central mechanism of action of curcumin.

**Methods:** For intracerebroventricular (ICV) injections, one stainless steel guide cannula was implanted into the left lateral ventricle of the brain in anaesthetized rats. Muscle pain was induced by intramuscular (IM) injection of formalin (2.5%, 50  $\mu$ l) in the right gastrocnemius muscle, and the number of paw flinches and the time spent licking and biting of the injected paw were recorded at 5-min blocks for 1 h.

**Results:** A marked biphasic pain response was observed due to formalin injection. Oral administration of curcumin at doses of 25 and 100 mg/kg significantly ( $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively) decreased both phases of muscle pain. Pain intensity was not influenced by alone ICV injection of naloxone and AM251 ( $p > 0.05$ ), whereas the suppressive effect of 100 mg/kg curcumin was inhibited by ICV administration of 2  $\mu$ g naloxone and 2  $\mu$ g AM251 ( $p < 0.001$ ). All the above-mentioned treatments did not alter locomotor activity.

**Conclusion:** These results showed that curcumin produced an antinociceptive effect in muscle pain. Central opioid and cannabinoid receptors might be involved in the antinociception induced by curcumin.

**Keywords:** Lateral ventricle, Muscle pain, Curcumin, Opioid receptors, Cannabinoid receptors

Please cite this article as follows:

Naqshbandi N, Tamaddonfard E, Erfanparast A, Soltanolinejad-Taghiabad F, The role of central opioid and CB1 cannabinoid receptors in the antinociceptive effect of curcumin on the formalin-induced muscle pain in rats. *Iran J Physiol Pharmacol* 7 (2023) 32-45.

\*Corresponding authors: e.tamaddonfard@urmia.ac.com, e.tamaddonfard@gmail.com (ORCID: 0000-0001-8240-5885)