پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۵، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۰، صفحات ۱۸۹ تا ۱۹۴

مقاله اصلی
(Original Article)

تاثیر دوزهای عصاره متانولی دانه گیاه هل بر رفتار ترس در موش صحرایی نر بالغ

دکتر غلامحسن واعظی*[1]، ریحانه پوزش[1]، دکتر محمد رضا خواجه دلوئی[2]

[1] گروه فیزیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان
[2] گروه علوم پایه، دانشگاه پیام نور مشهد

چکیده

سابقه و هدف: *ترس یک واکنش احساسی به تهدید یا خطر است. ترس بیمارگونه مدت‌ها با فرد باقی می ماند. با توجه به سوابق تاثیر مثبت گیاه هل بر ترس، در این پژوهش تاثیر دانه گیاه هل بر رفتار ترس در موش صحرایی نر بالغ مورد بررسی قرار گرفته است.*

روش بررسی: *در این تحقیق تجربی حیوانات تحت آزمایش به ۳ گروه کلی تقسیم گردیدند: گروه کنترل (سالین) (n=۶) که ۱ میکرولیتر سرم فیریولوژی را به صورت تزریق درون بطن-مغزی(i.c.v) دریافت کردند؛ گروه دوم که پنتیلن تترازول (PTZ) را به میزان ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت تزریق درون صفاقی (i.p) دریافت کردند و گروه سوم که عصاره متانولی دانه گیاه هل را در دوزهای ۳، ۱۰ و ۳۰ میکروگرم برای هر موش به صورت تزریق i.c.v و به دنبال آن ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم PTZ را به صورت تزریق i.p دریافت کردند. دستگاه استریوتاکس برای جراحی و دستگاه plus-maze برای بررسی رفتار ترس استفاده گردید. تحلیل داده‌ها با روش واریانس یک طرفه و تست تعقیبی Tukey انجام گردید.*

یافته‌ها: *دوزهای تزریق شده از عصاره، درصد زمان حضور موش‌ها در بازوی باز (OAT%) و درصد دفعات ورود به بازوی باز (OAE%) را نسبت به گروه کنترل افزایش داد. دوز ۳۰۳۰ میکروگرم برای هر موش، این افزایش را به طور معنی‌داری در OAT% و OAE% نشان داد ($p<۰/۰۱$).*

نتیجه‌گیری *به نظر می‌رسد که ترکیبات عصاره دانه گیاه هل می‌تواند رفتار ترس القا شده ناشی از PTZ را کاهش دهد.*

واژگان کلیدی: *عصاره متانولی، دانه هل، ترس، پنتیلن تترازول، تزریق درون بطن - مغزی، موش صحرایی.*

مقدمه

ترس به عنوان یکی از رفتارهای تدافعی است که در حیات موجود زنده موثر است (۱). بروز رفتار ترس در جانوران به شکل‌های مختلف از جمله تغییر فعالیت‌های حرکتی ظاهر می‌شود. مسیرهای اصلی مغز در برانگیختگی ترس آمیگدال، مناطق حسی از کورتکس و تالاموس می‌باشد (۲).

نوروترانسمیترهای متفاوتی نظیر سروتونین، دوپامین، گاما آمینو بوتیریک اسید (GABA) (۳) و رسپتور گلوتاماتی NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) در رفتار ترس نقش دارند. قسمت‌های مختلف مغز در واسطه‌گری ترس و اضطراب نقش دارند که از مهم‌ترین آنها آمیگدال، هیپوتالاموس، هیپوکامپ و سپتوم را می‌توان نام برد (۴). آمیگدال بازولترال نقش مهمی در ترس و در یادگیری ترس دارد (۶،۵).

هل به خانواده Zingiberaceae (زنجبیلیان) تعلق دارد (۸،۷) و گیاه بومی هند، پاکستان، برمه و سریلانکا است (۹). همچنین به عنوان داروی موثر ضد نفخ، ضد باکتری، ضد ویروسی و ضدقارچ در نظر گرفته شده و در درمان یبوست، قولنج، اسهال،

آدرس نویسنده مسئول: دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دکتر غلامحسن واعظی
(**e-mail:** gn_vaezi@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۹/۱
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۱۰/۵

سوءهاضمه، استفراغ، سردرد، صرع و بیماری های قلبی و عروقی موثر است (۱۰،۱۱). هل از نظر طب قدیم ایران گرم و خشک است و برای رفع بیماری‌های چشم و تسکین درد رماتیسم، گوش درد مفید است.تب را پایین می آورد، معالج سرماخوردگی است و آرام بخش است.

مطالعات فیتوشیمیایی نشان می‌دهد که هل دارای ترکیبات شیمیایی نظیر آلفا- ترپینئون، منتون، آلفا- فلاندرنا، سینئون، لیمونن، سابینن، هپتان، myrcene، سیتوستنون، بتا -نرولیدول، لینالول، بتا-پینین، آلفا پینین، eugenyl acetate، فیتال، گاما- سیتوسترول، سیترونیلول، ترپینین (۱۶-۱۲) می‌باشد. آنالیز شیمیایی نشان می‌دهد که هل محتوی آلکالویید، فلاونویید، ساپونین، استرول وتانن می باشد. ترکیب citronellol این گیاه به عنوان ماده آرام بخش و ضد افسردگی شناخته شده است (۱۶).

ترس همراه با علایمی نظیر بی‌آرامی، شل کردن عضلات به سختی، از دست دادن تمرکز، بی‌خوابی و نشانه‌های جسمی نظیر تپش قلب، اسپاسم ماهیچه، عرق کردن، احساس خفگی، سردرد و حالت تهوع همراه است.

پنتیلن‌تترازول دارویی است که به عنوان محرک تنفسی به کار می‌رود. استفاده از مقادیر زیاد دارو می‌تواند موجب تشنج گردد، لذا در کارهای تحقیقاتی برای ایجاد تشنج در حیوانات به کار می رود. پنتیلن تترازول توسط Hungarian (نورولوژیست آمریکایی) و Ladislas Meduna در سال ۱۹۳۴ مطرح شد. نام بین المللی از مترازول به عنوان پنتترازول شناخته شده است. پنتیلن تترازول آنتاگونیست گابا (GABA) است. مطالعات الکتروفیزیولوژیکی نشان می‌دهد که افزایش نفوذپذیری جریان یون‌هایی نظیر پتاسیم، سدیم، وکلسیم در تحریک پذیری غشای نورونی موثر است، را در غشا ایجاد می کند. PTZ به عنوان یک نمونه داروی اضطرابی در مدل‌های حیوانات از اضطراب و ترس مورد استفاده قرار گرفته است. پنتیلن تترازول گیرنده‌هایی نظیر سروتونین (5-HT3، HT1A-5)، NMDA (N-Methyl- D-Aspartat) گلایسین و لیگاندهای کانال کلسیم نوع L را تحت تاثیر قرارمی دهد (۱۷). PTZ در بازسازی حافظه و هوش و یادگیری نقش دارد و از آن برای درمان سندروم داون استفاده می شود (۱۸). به منظور تعیین دوزهای عصاره متانولی دانه گیاه هل بر رفتار ترس، این تحقیق روی موش صحرایی نر بالغ انجام گرفت.

مواد و روشها

این تحقیق به روش تجربی انجام گرفت. در این پژوهش از موش‌های نر بالغ نژاد ویستار با میانگین وزنی ۲۰±۲۰۰ گرم استفاده گردید. حیوانات از انستیتو رازی کرج خریداری شده و به حیوان‌خانه دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان منتقل شدند. موش‌ها در شرایط استاندارد تا رسیدن به محدوده وزنی فوق پرورش داده شدند. در هر قفس تعداد چهار رت نگهداری شد. محل نگهداری حیوانات از نظر شرایط فیزیکی دارای دوره ۱۲ ساعته روشنایی-تاریکی و دمای۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۶۰-۴۰ درصد و بدون آلودگی صوتی بود و آزمایشات مورد نظر در زمان معینی از روز صورت گرفت.

ابتدا موش‌ها را با ترازو وزن نموده و سپس داروی بیهوشی کتامین و زایلازین بر اساس وزن حیوان با استفاده از سرنگ انسولین به صورت داخل صفاقی به موش تزریق گردید. بعد از بی‌هوشی کامل موش، موهای پشت سر حیوان با استفاده از دستگاه اصلاح برداشته و سپس موش در روی دستگاه استریوتاکس قرار داده شد. دستگاه استریوتاکس دارای یک Head holder است که جمجمه حیوان را در وضعیت مناسب نگه می‌دارد. همچنین دارای یک قسمت نگه دارنده کانول یا الکترود می‌باشد که می توان آن را در امتداد محور جلویی-عقبی، پشتی-شکمی و میانی-طرفی حرکت داد. میله دندانی در مقیاس ۳/۳ میلی‌متر زیر صفر افقی تنظیم شد. سپس میله‌های گوشی را کاملا در سوراخ مجرای گوش خارجی به صورتی که به پرده صماخ حیوان آسیبی وارد نشود قرار داده، سپس دندان های پیشین حیوان روی میله دندانی قرار داده می‌شود و میله پوزه بند را به عقب کشیده و پیچ آن محکم بسته می‌شود. در آخر بعد از اطمینان از فیکس شدن حیوان، به وسیله تیغ جراحی استریل پوست جمجمه را از ناحیه بین دو چشم به طول ۱/۵-۱ سانتیمتر به طور عمودی برش دادیم. سپس پوست سر حیوان را کنار زدیم و بافت ماهیچه‌ای روی جمجمه را توسط پنس و قیچی برداشتیم تا محل براگما و لامبدا کاملا مشخص شود. پس از تعیین نقاط براگما و لامبدا محل قرار گرفتن کانول راهنما را با استفاده از اطلس پاکسینوس و واتسون مختصات بطن طرف راست به صورت AP=-۰/۸ و ML=+۱/۶ از ناحیه براگما محاسبه نمود (۱۹) و محل ناحیه بطن روی جمجمه علامت گذاری شد. نقطه موردنظر را با مته‌ای به قطر ۷ میلی‌متر، با دقت و فشار کم سوراخ کردیم و کانول راهنما را که از سر سوزن Gauge ۲۱ تهیه شده بود درون این سوراخ تعبیه کردیم. پس از آن پیچ عینک را بر روی استخوان جمجمه تعبیه کردیم. سپس با استفاده از سیمان دندان‌پزشکی کانول راهنما کامل فیکس شد. بعد از جراحی به حیوان ۵ روز استراحت داده شد تا استرس و تخریب بافتی احتمالی که توسط جراحی صورت گرفته بود از بین برود. سپس تزریق عصاره بوسیله یک کانول تزریق Gauge ۲۷ که توسط یک رابط پلی اتیلن به سرنگ هامیلتون متصل بود انجام شد.

برای تهیه عصاره، دانه گیاه هل از بازار محلی مشهد خریداری شد. دانه هل تهیه شده، توسط آسیاب مکانیکی پودر شده و پودر حاصله تا زمان شروع آزمایش در شرایط مناسب حرارتی ۲۷-۲۵ نگهداری گردید. جهت تهیه عصاره، بعد از خرد شدن گیاه سه روز در متانل ۹۶ درصد خوابانیده شده و سپس با حذف حلال توسط دستگاه روتاری عصاره متانولی دانه گیاه هل به دست آمد. میزان درصد رطوبت ۴۱ درصد به دست آمد.

در این تحقیق، حیوانات به گروه‌های ۶ تایی تقسیم شدند. در گروه کنترل (saline)، حیوانات ۱ میکرولیتر محلول سرم فیزیولوژی دریافت کردند و تزریق بصورت i.c.v (تزریق درون بطن-مغزی) صورت گرفت. در گروه دوم حیوانات به عنوان شاهد، پنتیلن تترازول (PTZ) را به میزان ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت و تزریق بصورت i.p (تزریق درون صفاقی) صورت گرفت. در گروه‌های تجربی، حیوانات در ۳ گروه عصاره متانولی دانه گیاه هل را با دوزهای ۳، ۱۰ و ۳۰ میکروگرم در هر موش به صورت درون بطنی-مغزی (i.c.v) و مقدار ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم PTZ را به صورت درون صفاقی (i.p) دریافت نمودند.

برای سنجش رفتار ترس مدل رفتاری Elevated plus-maze مورد استفاده قرار گرفت (۲۱،۲۰). این ابزار از جنس چوب و دارای چهار بازو به شکل علامت (+) است. ابعاد راهروی باز و بسته ۱۰x۵۰ سانتی‌متر و دو طرف و انتهای راهروی بسته دیواره‌ای به بلندی ۴۰ سانتی‌متر داشته و برای جلوگیری از افتادن موش ها در دو طرف و انتهای راهروی باز لبه‌ای به ارتفاع ۱ سانتی‌متر از جنس شیشه نصب گردیده است. چهار راهرو به یک محدوده مرکزی به ابعاد ۱۰x۱۰ سانتی‌متر منتهی می‌شود. maze توسط پایه‌هایی در ارتفاع ۵۰ سانتی‌متر از سطح زمین قرار می‌گیرند.

موش‌ها درون محدوده مرکزی maze قرار داده می شوند، به طوری که رو به یک راهروی باز قرار می‌گیرند. نور مناسب توسط یک لامپ ۱۰۰ واتی که در ارتفاع ۱۲۰ سانتی‌متر از مرکز maze قرار دارد، تامین می‌شود. در مدت ۵ دقیقه‌ای که حیوان آزادانه در قسمت‌های مختلف maze حرکت می‌کرد پارامترهای زیر با استفاده از کرونومتر باید اندازه‌گیری شود:

۱-مدت زمانی که حیوان در راهروی باز باقی می ماند (%OAT).

۲- مدت زمانی که حیوان در راهروی بسته باقی می‌ماند (%CAT).

۳- تعداد دفعاتی که حیوان وارد راهروی باز می‌شود (%OAE).

۴- تعداد دفعاتی که حیوان وارد راهروی بسته می‌شود (%CAE).

۵- میزان فعالیت حرکتی که عبارت بود از تعداد کل دفعات ورود به بازوی باز و بسته ماز، به واسطه مشاهده مستقیم اندازه گیری شد (Locomotion/) (۲۰،۲۲).

برای هر حیوان درصد ورود به راهروی باز و درصد زمان گذرانده شده در راهروی باز به طریق زیر محاسبه شد:

$$\% \ OAE = \frac{OAE}{OAE + CAE} \times 100$$

$$\% \ OAT = \frac{OAT}{OAT + CAT} \times 100$$

بعد از اتمام آزمایشات مغز کلیه نمونه‌ها توسط سرنگ هامیلتون یک میکرولیتر بلودومتیلن داخل کانول تزریق شد. سپس رت‌ها توسط کلروفرم کشته شدند و مغز آنها از جمجمه خارج شد و در فرمالین ۱۰ درصد برای مدت ۳ روز قرار داده شد تا بافت مغز کاملا تثبیت شود. سپس موقعیت کانول تزریق بررسی شد و رت‌هایی که کانول تزریق آنها در داخل بطن قرار نگرفته بود، از دور آزمایش حذف گردید و فقط تجزیه و تحلیل شامل رت‌هایی بود که کانول تزریق آنها در داخل بطن قرار گرفته بود (شکل ۱).

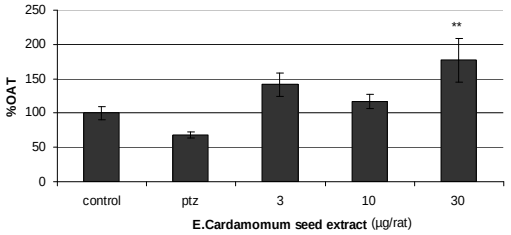
شکل ۱- بافت مغز رت‌های مورد مطالعه

نتایج بصورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار spss و آنالیز واریانس یک طرفه One way ANOVA و تست تعقیبی Tukey انجام گردید. سطح معنی‌داری داده‌ها در $p<0/05$ بررسی گردید.

یافته‌ها

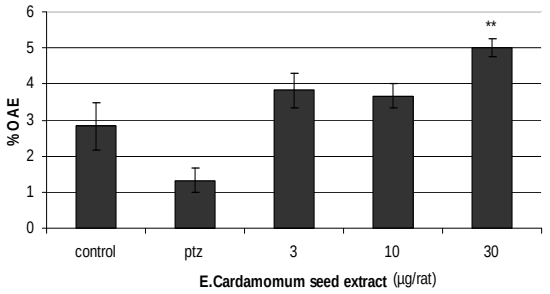
نتایج حاصل از پژوهش نشان داد که تزریق درون بطنی-مغزی دوز ۳، ۱۰ و ۳۰ میکروگرم بر رت از عصاره به همراه تزریق درون صفاقی به میزان ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از ترکیب PTZ، میانگین و انحراف معیار درصد زمان حضور در بازوی باز (%OAT) را نسبت به گروه کنترل افزایش داد که این افزایش در دو دوز ۳ و ۱۰ میکروگرم بر رت از نظر آماری معنی‌دار

نبود، ولی در دوز ۳۰ میکروگرم بر رت این افزایش از نظر آماری معنی‌دار بود (p<۰/۰۱) (نمودار۱).



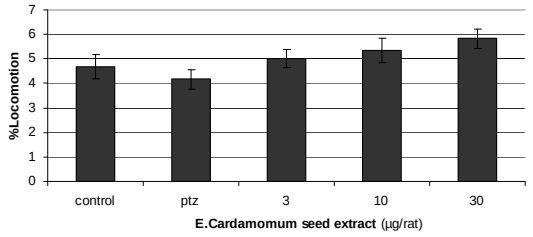
نمودار ۱- اثر تزریق دوزهای ۳، ۱۰ و ۳۰ عصاره متانولی دانه گیاه هل بر OAT% در مقایسه با گروه کنترل. مقایسه میانگین و انحراف معیار گروه های تجربی دریافت کننده دوزهای مختلف عصاره دانه گیاه E.cardamomum (۳، ۱۰ و ۳۰) و گروه دریافت کننده PTZ با گروه کنترل در درصد زمان سپری شده در بازوی باز (OAT%) (p<۰/۰۱**) (علامت ستاره بیانگر اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل است. داده ها به صورت میانگین± خطای معیار گزارش شده است. E.C: Elettaria Cardamomum Control: saline positive control: PTZ N= 6

تزریق درون بطنی-مغزی دوز ۳، ۱۰، ۳۰ میکروگرم بر رت از عصاره به همراه تزریق درون صفاقی به میزان ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از ترکیب PTZ، میانگین و انحراف معیار درصد دفعاتی که حیوان وارد بازوی باز (OAE%) می‌شود را نسبت به گروه کنترل افزایش داد که این افزایش در دو دوز ۳ و ۱۰ میکروگرم بر رت از نظر آماری معنی‌دار نبود ولی در دوز ۳۰ میکروگرم بر رت این افزایش از نظر آماری معنی‌دار بود (p<۰/۰۱) (نمودار۲).



نمودار ۲- اثر تزریق دوزهای ۳، ۱۰ و ۳۰ میکروگرم بر رت عصاره متانولی دانه گیاه هل بر OAE% در مقایسه با گروه کنترل. مقایسه میانگین و انحراف معیار گروه های تجربی دریافت کننده دوزهای مختلف عصاره دانه گیاه E.cardamomum (۳، ۱۰ و ۳۰ میکروگرم بر رت) و گروه دریافت کننده PTZ با گروه کنترل در درصد ورود به بازوی باز (OAE%) (p<۰/۰۱**) (علامت ستاره بیانگر اختلاف معنی دار با گروه کنترل است). داده ها به صورت میانگین± خطای معیار گزارش شده است. E.C: Elettaria Cardamomum Control: saline positive control: PTZ N= 6

گروه های تزریقی درون بطنی-مغزی با دوزهای ۳، ۱۰ و ۳۰ میکروگرم بر رت از عصاره به همراه تزریق درون صفاقی به میزان ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از ترکیب PTZ، میانگین و انحراف معیار میزان فعالیت حرکتی حیوان را نسبت به گروه کنترل افزایش داد که این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (نمودار ۳).



نمودار ۳- اثر تزریق دوز های ۳، ۱۰ و ۳۰ میکروگرم بر رت عصاره متانولی دانه گیاه هل بر میزان فعالیت حرکتی در مقایسه با گروه کنترل. مقایسه میانگین و انحراف معیار گروه های تجربی دریافت کننده دوزهای مختلف عصاره دانه گیاه E.cardamomum (۳، ۱۰ و ۳۰ میکروگرم بر رت) و گروه دریافت کننده PTZ با گروه کنترل بر میزان فعالیت حرکتی حیوان (Locomction%). داده ها به صورت میانگین± خطای معیار گزارش شده است. E.C: Elettaria Cardamomum Control: saline positive control: PTZ N= 6

بحث

تحقیق نشان داد که عصاره متانولی دانه گیاه هل، رفتار ترس را کاهش داد. این اثر در هر سه گروه دریافت کننده با دوزهای مختلف عصاره مشهود بود. سه دوز مورد استفاده ۳، ۱۰ و ۳۰ میکروگرم بر رت توانست درصد ورود به بازوی باز (OAE%) و همچنین زمان حضور در این بازو (OAT%) را در EMP نسبت به گروه کنترل افزایش دهد و تنها دوز ۳۰ میکروگرم بر رت نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار زمان اقامت در بازوی باز را نشان داد (p<۰/۰۱).

گروه دریافت کننده OAE% و OAT% کمتری را نسبت به گروه کنترل نشان داد که نشان دهنده کاهش ترس می‌باشد. در جستجوی بانک های اطلاعاتی علمی معتبر تاکنون گزارشی مبنی بر بررسی اثر عصاره دانه گیاه هل بر رفتار ترس در موش صحرایی، موش سوری، خرگوش و دیگر حیوانات آزمایشگاهی وجود نداشت و از این نظر پژوهش حاضر فاقد سابقه قبلی است.

در این مطالعه، دوزهای ۳، ۱۰ و ۳۰ میکروگرم بر رت برای تزریق درون بطنی-مغزی انتخاب گردید. سه دوز مورد استفاده توانست رفتار ترس را نسبت به گروه کنترل کاهش و زمان افزایش در بازوی باز را نشان دهد که تنها دوز ۳۰ میکروگرم

بر رت نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار زمان اقامت در بازوی باز را نشان داد ($p<۰/۰۱$).

طبق تحقیقات، این گیاه دارای ترکیباتی به نام فلاونوئید است و این ترکیبات دارای خاصیت آرام‌بخشی دارد. این احتمال وجود دارد که فلاونوئیدهای موجود در دانه گیاه هل محور HPA (Hypothalamic- Pituitary- Adrenal) را مهار کنند و این محور در استرس و اضطراب فعال می‌شود، پس با مهار این محور اضطراب و ترس نیز کاهش می‌یابد (۲۳).

گزارش‌هایی مبنی بر تاثیر فلاونویدها بر گیرنده‌های بنزودیازپینی وجود دارد. با توجه به وجود فلاونویدها در این گیاه احتمال این که عصاره از طریق تاثیر بر گیرنده‌های بنزودیازپین متصل به گیرنده‌های $GABA_A$ باعث کاهش ترس و آرام‌بخشی می‌گردد (۲۴).

اکثر اثرات عصاره دانه گیاه هل به علت وجود ترکیبات ساپونین و فلاونویید می‌باشد که به ترتیب ساپونین فعالیت کلینرژیک و فلاونویید به عنوان آنتاگونیست کلسیم مطرح شده‌اند.

در این تحقیق، ما از PTZ به عنوان ماده القا کننده ترس استفاده کردیم. بررسی نشان داده شده است که PTZ غلظت یون کلسیم درون سلولی را افزایش می‌دهد که این افزایش غلظت یون کلسیم مانع از بروز اثرات مهاری ناشی از GABA می‌شود. آنالیز شیمیایی این گیاه نشان می‌دهد که دارای ترکیب فلاونویید می‌باشد و این ترکیب به عنوان آنتاگونیست کلسیم در نظر گرفته شده است (۲۵). در نتیجه این ماده اثر PTZ را به واسطه مهار گیرنده‌های NMDA کاهش داده و از افزایش غلظت یون کلسیم درون سلولی جلوگیری می‌کند که در نتیجه باعث تشدید فعالیت گیرنده های گابا درسلول عصبی شده و به این ترتیب از القا ترس ناشی از PTZ ممانعت می‌شود.

این پژوهش نشان داد که با توجه به ترکیبات موجود در عصاره دانه گیاه هل و تاثیر آن بر نحوه عملکرد سیستم گابائرژیک و کولینرژیک، رفتار ترس القا شده ناشی از ترکیب PTZ کاهش می‌یابد.

REFERENCES

1. Blanchard RJ, Blanchard DC. An ethnoexperimental analysis of defense, fear, and anxiety. In: McNaughton N, Andrews G, editors. Anxiety. Otago. Conference Series, No.1, Dunedin, New Zealand: University of Otago Press; 1990. p. 124-33.

2- Nader K, Majidishad P, Amorapanth P, LeDoux JE. Damage to the lateral and central, but not other, amygdaloid nuclei prevents the acquisition of auditory fear conditioning. Learn Mem 2001; 8: 156-63.

3- Flores-Gracia C, Nuche-Bricaire A, Crespo-Ramírez M, Miledi R, Fuxe K, Pérez de la Mora M. GABA(A) ρ receptor mechanisms in the rat amygdala and its role in the modulation of fear and anxiety. Psychopharmacology (Berl) 2010; 212: 475-84.

4- LeDoux J. The emotional brain, fear, and the amygdale. Cell Mol Neurobiol 2003; 23: 727-38.

5- Walker DL,Toufexis DJ,Davis M.Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdale in fear, stress, and anxiety. Eur J Pharmacol 2003; 463: 199-216.

6- Wilensky AE, Schafe GE, Kristensen MP, LeDoux JE. Rethinking the fear circuit: the central nucleus of the amygdale is required for the acquisition, consolidation, and expression of pavlovian fear conditioning. J Neurosci 2006; 26: 12387-96.

7- Lucchesi ME, Smadja J, Bradshaw S, Louw W, Chemat F. Solvent free microwave extraction of *Elettaria cardamomum L.* A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. Journal of Food Engineering 2007; 79: 1079-86.

8- Mehra K. Indian system of innovation in biotechnology- A case study of Cardamom. Technovation 2001; 21: 15-23.

9- Nadkarni K, Nadkarni M, editors. Indian Materia Medica. 3rd ed. Bombay: popular prakasham; 1976. p.475-76.

10- Duke JA, Duke MJ, Bogenschutz-Godwin J, Ducelliar PK, editors. Hand book of medicinal herbs. 2nd ed. Boca Raton: CRC press; 2002. p.153-54.

11- Khan NA, Rahman SZ. The screening of Majoon-e-Azaraqi for cardiovascular and peripheral activity. Hamdard Med 1992; 35: 102-109.

12- Okugawa H, Okugawa M, Moriyasu S, Matsushita K, Saiki Y, Hashimotoenfle K, et al. Evaluation of crude drugs by a combination of enfleurage and chromatography on flavor components in seeds of *Amomum cardamomum* and *Elettaria cardamomum*. Shoyakugaku Zasshi 1988; 42: 94-97.

13- Shaban MAE, Shaban KM, Kan deel GA, Yacout S,Mehaseb E. The chemical composition of the volatile oil of *Elettaria cardamomum* seeds. Pharmazie 1987; 42: 207-208.

14- Gopalakrishnan M, Gopalakrishnan C, Narayanan S, Grenz M. Non saponifiable lipid constituents of cardamom. Agri Food Chem 1990; 38: 2133-36.

15- Duke J, Duke A. Handbook of phytochemical constituents of GRAS Herbs and other economical plants. London: CRC press; 1992. p.239-40.

16- McMahon C. Lemon-scented tea tree-fragrant harvest. White Lotus Aronatics Newsletter.

17- Jung M, Lal H, Gatch M. The discriminative stimulus effects of pentylenetetrazol as amodel of anxiety: recent developments. Neurosci Biobehav Rev 2002; 26: 429-39.

18- Minkel JR. Drug may counteract Down syndrome. Scientific American 2007; 25: 3-20.

19- Paxinus G, Watson C, editors. The rat brain in stereotaxic coordinates. 3rd ed. Philadelphia: Academic Press; 1997. p.170-71.

20- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: Closed arm entries in an Elevated plus-maze as a measure of anxity in the rat. J Ncurosci Methods 1985; 14: 149-67.

21- Rodgers RJ. Animal models of anxiety: where next. Behav Pharmac 1997; 8: 470-96.

22- Pérez de la Mora M, Lara-García D, Jacobsen KX, Vázquez-García M, Crespo-Ramírez M, Flores-Gracia C. Anxiolytic-like effects of the selective metabotropic glutamate receptor 5 antagonist MPEP after its intra-amygdaloid microinjection in three different non-conditioned rat models of anxiety. Eur J Neurosci 2006; 23: 2749-59.

23- Butterweck V, Hegger M, Winterhoff H. Flavonoids of St. John's Wort reduce HPA axis function in the rat. Planta Med 2004; 70: 1008-11.

24- Salah SM, Jager AK. Screening of traditionally used Lebanese herbs for neurological activities. J Ethnopharmacol 2005; 97: 145-49.

25- Gilani A, Gilani H, Aftab K, Ahmad S. Cholinergic actions of crude saponinsFrom Castanospermum austral. Int J Pharm 2002; 32: 209-16.