

Analgesic Effect of Alcoholic Extract of *Morus alba* L. Leaf on Male Rats

Mohammadifar M.¹ BSc, Tamtaji O.R.² BSc, Behnam M.² BSc, Taghizadeh M.¹ PhD, Talae S.A.* PhD

*Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

¹Biochemistry and Nutrition in Metabolic Diseases Research Center,
Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

²Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

Abstract

Aims: As effective herbal materials, flavonoids and the phenolic compounds are with anti-pain and anti-inflammatory effects. Based on the studies, there is a huge amount of polyphenols and flavonoids in the leaves of *Morus alba* L. Therefore, the aim of this study was to investigate the anti-pain effects of alcoholic extract of the leaves of *Morus alba* L. on the rats.

Materials & Methods: In the experimental study, 32 male Wistar rats were divided into 4 groups including control group and groups receiving 100, 200, and 400mg/kg alcoholic extract of the leaves of *Morus alba* L. There was 4-week daily extract gavage. The anti-pain effect of the extract was investigated through thermal hyperalgesia, writhing, tail flick, and formalin tests. Data was analyzed by SPSS 16 software using one-way ANOVA and Tukey's post-hoc tests.

Findings: Daily use of 100, 200, and 400mg/kg of alcoholic extract of the leaves of *Morus alba* L. for 4 weeks led to significant increases in the mean foot withdrawal latency ($p < 0.001$) and mean tail withdrawal latency ($p < 0.001$) and significant reductions in the percentage of abdominal constriction ($p < 0.001$) and pain feeling in both acute ($p < 0.05$) and chronic ($p < 0.01$) phases of formalin test than control group. Nevertheless, the effect of 200mg/kg dose was higher than the other doses.

Conclusion: Oral consumption of the alcoholic extract of the leaves of *Morus alba* L. leads to a reduction in pain feeling in the rats. In addition, the anti-pain effect of 200mg/kg dose is higher than other doses.

Keywords

Analgesics [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68000700>];

Morus [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68031625>];

Rats [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68051381>]

* Corresponding Author

Tel: +983155621157

Fax: +983155621157

Address: Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Qotbe Ravandi Boulevard, Kashan, Iran
talaei@kaums.ac.ir

Received: July 20, 2015

Accepted: January 11, 2016

ePublished: March 5, 2016

اثر ضددردی عصاره الکلی برگ توت سفید بر موش‌های صحرایی نر

مؤگان محمدی‌فر BSc

مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری‌های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

امیدرضا تمناجی BSc

مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

محمد بهنام BSc

مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

محسن تقی‌زاده PhD

مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری‌های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

سیدعلیرضا طلائی * PhD

مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

چکیده

اهداف: فلاونوئیدها و ترکیبات فنولی از جمله مواد موثره گیاهی هستند که اثرات ضد درد و ضد التهابی آنها ثابت شده است. نتایج مطالعات مختلف نشان داده است که برگ توت حاوی مقادیر قابل توجهی پلی‌فنول و فلاونوئید است. بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر ضددردی عصاره الکلی برگ توت سفید در موش‌های صحرایی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به چهار گروه ۸ تایی (گروه کنترل و گروه‌های دریافت‌کننده عصاره الکلی برگ توت سفید با دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تقسیم شدند. تجویز عصاره، روزانه به مدت ۴ هفته از طریق گاواژ انجام گرفت. اثر ضددردی عصاره توسط آزمون‌های هایپرآلژزای حرارتی، رایتینگ، غوطه‌ورسازی دم و آزمون فرمالین سنجیده شد. نتایج با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی و توسط نرم‌افزار SPSS 16 مورد تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: دریافت روزانه عصاره الکلی برگ توت سفید با دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۴ هفته باعث افزایش معنی‌دار میانگین مدت‌زمان عقب‌کشیدن پا ($p < 0/001$) و میانگین زمان پس‌کشیدن دم ($p < 0/001$) و کاهش معنی‌دار درصد انقباضات شکمی ($p < 0/001$) و احساس درد در آزمون فرمالین در هر دو فاز حاد ($p < 0/005$) و مزمن ($p < 0/01$) نسبت به گروه کنترل شد، ولی تاثیر دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به بقیه دوزها بیشتر بود.

نتیجه‌گیری: مصرف خوراکی عصاره الکلی برگ توت سفید باعث کاهش احساس درد در موش‌های صحرایی می‌شود که این اثر ضددردی در دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره بیشتر است.

کلیدواژه‌ها: ضد درد، برگ توت سفید، موش صحرایی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۴/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۲۱

*نویسنده مسئول: talaei@kaums.ac.ir

مقدمه

درد از مکانیزم‌های دفاعی بدن است که به‌هنگام آسیب بافتی ایجاد شده و سبب می‌شود فرد نسبت به محرک ایجادکننده درد واکنش نشان دهد. از آنجایی که تداوم درد بر کیفیت زندگی انسان اثرات نامطلوبی می‌گذارد، بشر همواره در پی راهی به‌منظور حذف یا تقلیل آن بوده است. امروزه از ضدالتهاب‌های غیراستروئیدی و مسکن‌های اپیوئیدی به‌عنوان داروی کاهنده (ضد) درد استفاده می‌شود[1]. با وجود استفاده فراوان از این داروها نمی‌توان از عوارض نامطلوب آنها چشم‌پوشی کرد. مساله مهم در استفاده از اپیوئیدها ایجاد تحمل و وابستگی به دارو است[2]. مصرف ضدالتهاب‌های غیراستروئیدی نیز منجر به ایجاد عوارض زیادی همچون اختلال کلیوی، زخم‌های گوارشی و خونریزی می‌شود[3]. با توجه به عوارض جانبی نامطلوب این داروها، محققان در پی جایگزینی این داروها با داروهای دارای عوارض جانبی کمتر و اثر ضددردی بیشتر هستند. عوارض کمتر داروهای گیاهی و نیز تنوع در مواد موثره گیاهان سبب شده این داروها مورد توجه قرار گیرند[4,5].

توت سفید با نام علمی *موروس آلبا* (*Morus alba L.*) درختی است از خانواده موراسه که در مناطق وسیعی از جهان از جمله ایران رشد می‌کند. استفاده درمانی از این گیاه در طب سنتی چین به‌عنوان تب‌بر، کاهنده فشار خون و تقویت‌کننده کبد رایج بوده است. قسمت‌های مختلف این گیاه از جمله میوه[6]، برگ و پوست ریشه[7] دارای کاربرد درمانی هستند. توت سفید دارای اثرات ضداسپاسمی و ضدروماتیسمی بوده و برای درمان دردهای مفصلی استفاده می‌شود[6].

نتایج آنالیز کروماتوگرافی مایع پرفشار (HPLC) برگ توت نشان داده است که برگ این گیاه حاوی مقادیر قابل توجهی پلی‌فنول و فلاونوئید است[8,9]. فلاونوئیدها و ترکیب‌های فنولی از جمله مواد موثره گیاهی هستند که اثرات ضد درد و ضدالتهابی آنها ثابت شده است[10,11]. فلاونوئیدها می‌توانند با مهار میانجی‌های التهابی از جمله پروستاگلاندین‌ها و نیتریک‌اکساید اثر ضددردی خود را اعمال کنند. اثرات ضددردی و ضدالتهابی گیاهانی چون بابونه و کاکائو را به وجود ترکیب‌های فنولی در آنها نسبت داده‌اند[12]. این ترکیبات عمدتاً از طریق مهار آنزیم‌های سیکلواکسیژناز و نیتریک‌اکساید سنتز عمل کرده و در تسکین درد ناشی از التهاب موثر هستند[13].

اثرات آنتی‌اکسیدانی برگ توت در مطالعات مختلفی نشان داده شده است[14,15]. آن‌دالو و همکاران نشان داده‌اند که فلاونوئیدهای موجود در برگ توت سفید می‌توانند در بهبود استرس اکسایشی در موش‌های صحرایی دیابتی موثر باشند[16]. به‌علاوه، بیان شده است که عصاره برگ توت سفید دارای اثرات مهارکنندگی نیتریک‌اکساید و پروستاگلاندین E2 است[17]. مطالعات انجام‌شده بر گیاهان خانواده توت نشان داده است که سایر اعضای این خانواده نیز دارای اثرات ضدالتهابی و ضددردی هستند[18]. توت قرمز و سیاه در بهبود

۸۰ درجه در یک بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری به حجم رسانده شد (۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر). از محلول فوق توسط پیپت مقادیر ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌لیتر برداشته و به بالن‌های حجمی ۱۰ میلی‌لیتری منتقل و با اتانول ۸۰ درجه به حجم رسانده شد تا غلظت‌های ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آید. از هر یک از محلول‌های اخیر با پیپت حجمی مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر برداشته و به بالن حجمی ۵ میلی‌لیتری انتقال داده شد. سپس به آن ۲ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درجه اضافه شد. به دنبال آن، به هر یک از بالن‌ها مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر محلول آلومینیوم کلراید ۱۰٪ (وزنی/وزنی) و ۰/۱ میلی‌لیتر محلول پتاسیم استات یک مولار اضافه شده و با اتانول ۸۰٪ به حجم رسانده شد. پس از ۳۰ دقیقه، جذب محلول‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر در برابر محلول شاهد ثبت شد (محلول شاهد شامل کلیه اجزا به جز محلول نمونه است که همزمان با بقیه تهیه می‌شود). این آزمایش برای هر غلظت سه بار تکرار شد و میانگین جذب هر غلظت برای رسم منحنی کالیبراسیون به کار برده شد. در نهایت برای تعیین مقدار فلاونوئید تام در نمونه، مقدار مشخصی از نمونه درون یک بالن رفلکس ۵۰ میلی‌لیتری توزین شد. سپس به آن ۸ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درجه اضافه شد و به مدت یک ساعت رفلکس شد. پس از سرد شدن مخلوط به وسیله کاغذ صافی واتمن نمره ۴۰ به داخل یک بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری صاف شد. محتویات بالن و صافی با مقدار کافی از اتانول ۸۰ درجه شسته و در نهایت محلول مورد نظر به حجم رسانده شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از این محلول توسط پیپت به بالن حجمی ۵ میلی‌لیتری منتقل شد و مشابه روش ذکر شده برای رسم منحنی کالیبراسیون با معرف آلومینیوم کلراید ۱۰٪ واکنش داده شد. این آزمایش شش مرتبه تکرار شد و میانگین جذب محلول‌ها در ۴۱۵ نانومتر به دست آمد.

تعیین مقدار ترکیبات فنولیک تام براساس گالیک اسید: برای رسم منحنی کالیبراسیون گالیک اسید، مقدار ۵/۵ میلی‌گرم از گالیک اسید استاندارد با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱ میلی‌گرم توزین شد و پس از حل کردن در مقداری آب در یک بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری، به حجم رسانده شد (۵۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر). از محلول فوق با پیپت مقادیر ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی‌لیتر برداشته و به بالن‌های حجمی ۵ میلی‌لیتری منتقل شد و سپس با آب به حجم رسانده شد. بدین ترتیب محلول‌های استاندارد از گالیک اسید با غلظت‌های ۵۵، ۱۱۰، ۱۶۵، ۲۲۰ و ۲۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. ۰/۲ میلی‌لیتر از هر یک از محلول‌های استاندارد فوق توسط پیپت به بالن‌های حجمی ۵ میلی‌لیتری منتقل شد. سپس به هر کدام از بالن‌ها ۲ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۲۵ میلی‌لیتر معرف فولین اضافه و سپس تکان داده شد. پس از گذشت ۲ دقیقه به هر یک از بالن‌ها، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول سدیم کربنات ۲۰٪ (حجمی/وزنی) افزوده شد و در نهایت با آب مقطر به حجم رسانده شد. محلول شاهد نیز به طور همزمان و به طریق مشابه بدون افزودن محلول نمونه به آن تهیه

استرس اکسایشی موثر بوده و نقش آنتی‌اکسیدانی دارند [19].
موروسین موجود در توت سیاه موجب کاهش درد در موش‌های آزمایشگاهی شده است [20].

با توجه به خواص درمانی برگ توت و نیز اثرات نامطلوب داروهای نارکوتیک و ضدالتهاب‌های غیراستروئیدی، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر ضدردی عصاره الکلی برگ توت سفید در موش‌های صحرایی انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی از ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم استفاده شد. موش‌ها به طور تصادفی به گروه‌های کنترل و دریافت‌کننده عصاره برگ توت با دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن تقسیم شدند (چهار گروه ۸ تایی). عصاره الکلی برگ توت به مدت ۴ هفته و هر روز راس ساعت ۱۰ صبح به صورت گاواژ تجویز شد. طی این مدت به گروه کنترل به منظور در نظر گرفتن استرس گاواژ آب مقطر داده شد. موش‌ها در طول مدت مطالعه با دسترسی آزاد به آب و غذا و در شرایط دمایی مناسب ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) نگهداری شدند. میزان رطوبت اتاق نگهداری از حیوانات ۴۰ تا ۵۰٪ بود. دوره شبانه‌روزی موش‌ها به صورت ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی تنظیم شد. تمامی دستورات اخلاقی مصوب کمیته اخلاق معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کاشان در مورد کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد.

تهیه عصاره الکلی برگ توت سفید: مقدار ۲۰ کیلوگرم برگ توت سفید وارسته دانه‌دار از شهر کاشان تهیه شده و پس از تایید گونه و وارسته آن توسط کارشناس کشاورزی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی شرکت باریج اسانس، آسیاب شد. عصاره‌گیری به روش پرکولاسیون با اتانول ۷۰٪ انجام شد. ترکیب حلال با پودر گیاه به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. سپس با استفاده از کاغذ صافی به میزان ۱ به ۱ حجمی عصاره گرفته شد. عصاره به دست‌آمده در داخل گرم‌خانه 40°C و دارای سیستم تهویه قرار داده شد تا غلظت ماده خشک آن افزایش یابد. به منظور تعیین میزان ماده خشک، رطوبت نمونه عصاره‌ها تعیین شد [21]. برای گاواژ کردن، عصاره خشک به میزان لازم در آب مقطر حل شده و مورد استفاده قرار می‌گرفت.

آنالیز عصاره: برای آنالیز عصاره، مقدار فلاونوئیدهای تام براساس کوئرستین و مقدار ترکیبات فنولیک تام براساس گالیک اسید به صورت زیر تعیین شد:

تعیین مقدار فلاونوئیدهای تام براساس کوئرستین: ابتدا برای رسم منحنی کالیبراسیون کوئرستین در واکنش با معرف آلومینیوم کلراید، ۵ میلی‌گرم کوئرستین استاندارد توسط ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱ میلی‌گرم توزین شد. پس از حل کردن کوئرستین در اتانول

چهارپایه قرار داده شد. حیوان ۳۰ دقیقه پیش از شروع هر آزمایش به اتاقک منتقل شد تا به محیط جدید عادت کند. پس از طی این زمان با استفاده از سرنگ انسولین میزان ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲/۵٪ به زیر پوست کف پای چپ حیوان تزریق شد. ویژگی مهم آزمون فرمالین ایجاد درد در دو مرحله است که یک مرحله کوتاه و اولیه بلافاصله بعد از تزریق (دقایق صفر تا ۱۵) و یک مرحله ثانویه و طولانی‌تر (دقایق ۲۰ تا ۵۰) است. درد در فاز اولیه ناشی از تحریک گیرنده‌های درد (درد نورولوژیک) بوده و درد مزمن به دنبال آسیب بافتی ناشی از تزریق فرمالین و التهاب ایجاد می‌شود (درد التهابی).

بعد از تزریق، حیوان با احتیاط به جایگاه ویژه بازگردانده شده و رفتارهای ناشی از تزریق فرمالین به مدت یک ساعت بررسی شد. رفتارهای ناشی از درد به صورت قراردادی به شرح زیر امتیازدهی شد: صفر: حیوان کف پای تزریق شده را روی زمین گذاشته و هیچ علامتی مبنی بر احساس درد نشان نداد.

یک: حیوان کف پای تزریق شده یا نوک انگشتان خود را با احتیاط روی زمین گذاشته، اما وزن خود را روی آن قرار نداد.
دو: حیوان کاملاً پای تزریق شده را از زمین بلند کرده و بدون هیچ تماسی به زمین نزدیک بدن خود قرار داد.
سه: حیوان علاوه بر بالا آوردن پای تزریق شده، شروع به تکان دادن، لیسیدن یا گازگرفتن آن کرد.

آنالیز آماری: پس از جمع‌آوری داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف، از نرمال بودن آنها اطمینان حاصل شد. داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و برای مقایسه دوه‌دوی گروه‌ها از پس‌آزمون توکی استفاده شد. تمامی آزمون‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 انجام شد.

یافته‌ها

میانگین مدت‌زمان تاخیر در عقب‌کشیدن پا در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0.0001$). به عبارت دیگر، دریافت عصاره الکلی برگ توت، تحمل درد ناشی از حرارت را بهبود بخشید. میانگین زمان تاخیر در عقب‌کشیدن پا برای گروه کنترل $9/5 \pm 0/42$ ثانیه بود و دریافت عصاره با دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم به ترتیب این زمان را به $15/33 \pm 0/86$ ، $17/75 \pm 0/39$ و $16/17 \pm 0/61$ ثانیه افزایش داد ($p < 0/001$).

میانگین زمان پس‌کشیدن دم بین گروه‌های مطالعه دارای اختلاف معنی‌داری بود ($p < 0/0001$). اختلاف میانگین زمان پس‌کشیدن دم در گروه دریافت‌کننده دوز ۱۰۰ میلی‌گرم عصاره ($p < 0/05$) و در گروه‌های دریافت‌کننده دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم عصاره ($p < 0/001$) نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود (نمودار ۱).

پس از گذشت ۲ ساعت از به‌حجم‌رساندن محلول‌ها، جذب آنها در طول موج ۷۶۰ نانومتر در برابر محلول شاهد ثبت شد. این آزمایش برای هر غلظت سه مرتبه تکرار و میانگین جذب برای هر غلظت محاسبه شد و سپس منحنی کالیبراسیون رسم شد. در نهایت به منظور تعیین مقدار ترکیبات فنولیک تام در نمونه، مقدار مشخصی از نمونه درون یک بالن رفلاکس ۵۰ میلی‌لیتری توزین شد و با اتانول ۸۰ درجه به حجم رسانده شد. ۰/۲ میلی‌لیتر از محلول اخیر توسط پیپت حجمی به بالن ژوژه ۵ میلی‌لیتری منتقل و مشابه روش ذکر شده برای رسم منحنی کالیبراسیون گالیک‌اسید با معرف فولین واکنش داده شد. میزان جذب محلول پس از ۲ ساعت در طول موج ۷۶۰ نانومتر در برابر محلول شاهد ثبت شد.

آزمون‌ها: ۴ هفته بعد از شروع گاواژ، برای بررسی اثر ضددردی عصاره الکلی برگ توت سفید، از آزمون‌های زیر استفاده شد:

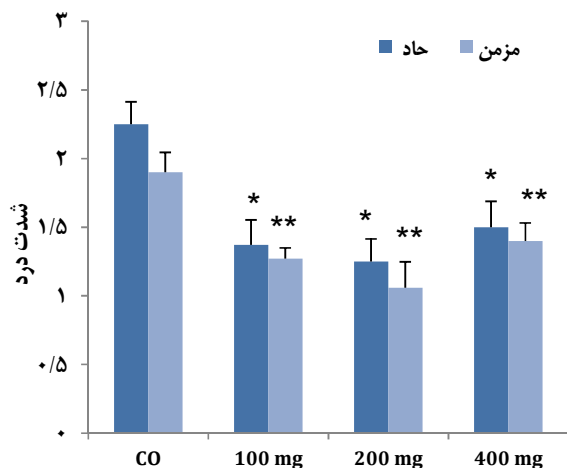
آزمون هایپرآلژزیای حرارتی: در این آزمایش با استفاده از دستگاه رادیان حرارتی (Ugo Bassil؛ ایتالیا) با تاباندن اشعه مادون قرمز به کف پای سالم حیوان میزان تحمل حیوان به حرارت مورد ارزیابی قرار گرفت. حرارت تولیدشده توسط اشعه $52-55^{\circ}\text{C}$ بود. حیوانات درون محفظه‌های پلکسی‌گلاس قرار داده شده و اشعه مادون قرمز از میان سطح پلکسی‌گلاس به بخش میانی کف پای حیوان تابانده شد. معیار تحمل محرک حرارتی، مدت‌زمان تاخیر در عقب‌کشیدن پا بود. این آزمون برای هر حیوان سه مرتبه و هر بار به فاصله ۵ تا ۱۰ دقیقه تکرار شد و نقطه برش آزمایش ۲۲ ثانیه بود [22].

آزمون غوطه‌ورسازی دم: در این آزمون حیوانات درون مقیدکننده قرار داده شدند و پس از سازگاری، دم آنها درون آب 49°C وارد شد. مدت‌زمانی که طول کشید تا موش دم خود را به بالا حرکت دهد ثبت شد. این آزمون برای هر حیوان ۴ بار و در زمان‌های صفر، ۲، ۴ و ۶ دقیقه تکرار شد. در صورتی که حیوان طی ۳۰ ثانیه دم خود را تکان نمی‌داد برای جلوگیری از آسیب دم، حیوان تا ۲ دقیقه بعد کنار گذاشته می‌شد [23].

آزمون رایتینگ: برای بررسی درد احشایی از این آزمون استفاده شد. در این آزمون تعداد انقباضات شکمی حیوان پس از تزریق استیک‌اسید ۰/۶٪ به مدت ۳۰ دقیقه شمارش شد. استیک‌اسید برای تمام گروه‌ها با دوز ۱۰ میلی‌لیتر بر کیلوگرم وزن حیوان و به صورت داخل‌صفای تزریق شد. انقباضات شکمی یا کشیدن حداقل یکی از اندام‌های حرکتی خلفی به‌عنوان یک رایت در نظر گرفته شد [24].

آزمون فرمالین: این آزمون، آزمایشی به‌منظور ارزیابی درد حاد و مزمن است. برای انجام مطالعه از روش *دایسیون* و *دنيس* استفاده شد [25]. برای انجام آزمون فرمالین حیوانات درون محفظه‌هایی با کف شیشه‌ای قرار گرفتند که روی یک چهارپایه آلومینیومی قرار داشت. برای آسان‌تر شدن مشاهدات یک آینه با زاویه ۴۵ درجه درون

کنترل به صورت معنی‌داری کاهش یافت ($p < 0.05$)، ولی اختلاف معنی‌داری در تاثیر ضددردی دوزهای مختلف عصاره مشاهده نشد ($p > 0.05$). در فاز مزمن نیز مصرف عصاره سبب کاهش احساس درد در تمام گروه‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم عصاره نسبت به گروه کنترل شد ($p < 0.01$)، اگر چه اختلاف بین سه دوز عصاره معنی‌دار نبود ($p > 0.05$; نمودار ۳).

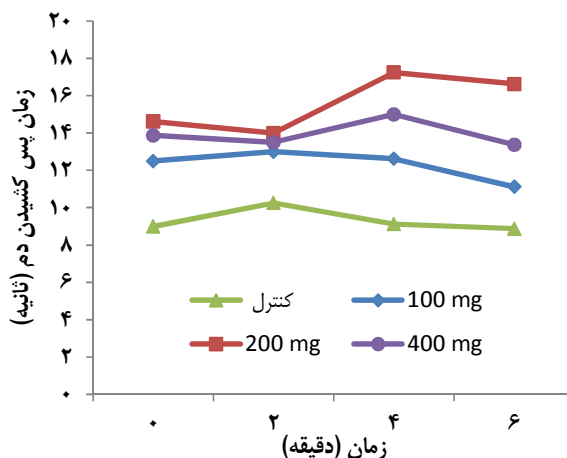


نمودار ۳) تاثیر دریافت دوزهای مختلف عصاره الکلی برگ توت سفید بر درد حاد و مزمن (التهاب) ناشی از تزریق فرمالین ($p < 0.05$ *) بین گروه کنترل با گروه‌های دریافت‌کننده عصاره در فاز حاد؛ $p < 0.01$ ** بین گروه کنترل با گروه‌های دریافت‌کننده عصاره در فاز مزمن

بحث

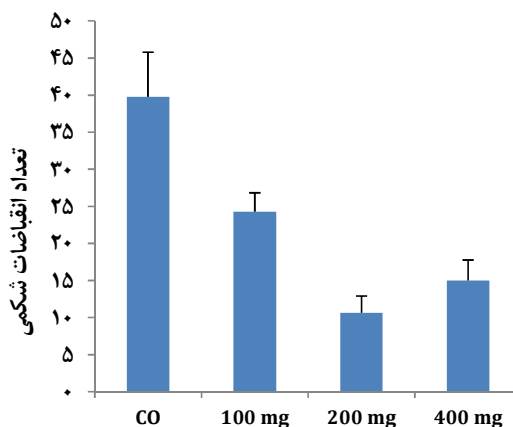
نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره الکلی برگ توت سفید می‌تواند شدت درد را در آزمون‌های هایپرانژیای حرارتی، غوطه‌ورسازی دم، رایتینگ و فرمالین کاهش دهد.

اگر چه اثرات آنتی‌اکسیدانی برگ توت در برخی پژوهش‌ها نشان داده شده است [8, 16]، اما براساس بررسی‌های صورت گرفته توسط ما تاکنون پژوهشی به منظور بررسی اثر ضددردی برگ توت سفید انجام نگرفته است. نشان داده شده است که عصاره هیدروالکلی برگ توت سفید می‌تواند از التهاب ناشی از تزریق کاراجینان در موش‌های صحرایی جلوگیری کند [26]. مطالعات انجام شده روی بعضی دیگر از گیاهان این خانواده حاکی از اثر ضد درد و ضدالتهابی این گیاهان است. گیاه شاه‌توت با نام علمی *Morus nigra L.* اثرات ضد درد و ضدالتهابی قابل توجهی دارد. در مطالعه‌ای بیان شده است که دوز ۳۰۰ میلی‌گرم عصاره برگ شاه‌توت در کاهش درد ناشی از آزمون‌های رایتینگ و صفحه داغ حتی نسبت به مورفین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و ایندومتاسین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بهتر عمل می‌کند. این اثر ضد درد را به ترکیبات فنولی شاه‌توت و اثر آنتی‌اکسیدانی آن نسبت می‌دهند [27]. از نظر فیزیولوژیک، درد حاد (نورونیک) ناشی از تحریک گیرنده‌های عصبی محیطی بوده و درد مزمن ناشی از آزادسازی



نمودار ۱) تاثیر دریافت دوزهای مختلف عصاره الکلی برگ توت سفید بر درد ناشی از غوطه‌ورسازی دم در آب داغ

میزان کشیدگی و انقباضات شکمی در موش‌های دریافت‌کننده عصاره برگ توت کاهش یافت ($p < 0.0001$). در واقع موش‌های دریافت‌کننده عصاره درد کمتری را احساس کردند. کاهش درصد انقباضات نسبت به گروه کنترل برای گروه گیرنده دوز ۱۰۰ میلی‌گرم عصاره برابر ۳۸/۹٪ ($p < 0.05$) و برای گروه‌های دریافت‌کننده ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم عصاره به ترتیب ۷۳/۲٪ و ۶۲/۲٪ ($p < 0.01$) بود. حداکثر اثر ضددردی در تجویز دوز ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره مشاهده شد (نمودار ۲).



نمودار ۲) تاثیر دریافت دوزهای مختلف عصاره الکلی برگ توت سفید بر درد ناشی از تزریق استیک‌اسید در آزمون رایتینگ (همه گروه‌ها در سطح ۰/۰۰۱ با گروه کنترل اختلاف معنی‌دار داشتند)

دریافت عصاره الکلی برگ توت باعث کاهش معنی‌داری در احساس درد ناشی از تزریق فرمالین در هر دو فاز حاد (دقایق صفر تا ۱۵) و مزمن (دقایق ۲۰ تا ۵۰) آزمون شد ($p < 0.0001$). در فاز اول آزمون فرمالین، بروز رفتارهای نشان‌دهنده درد در گروه‌های گیرنده دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم عصاره نسبت به گروه

التهاب می‌شود^[43]. مشخص شده است کوئرتستین موجود در چای سبز در آزمون رایتینگ اثر ضد درد خوبی از خود نشان داده است^[44]. همچنین عصاره چای سبز سبب کاهش درد در آزمون‌های فرمالین و پس‌کشیدن دم در موش‌های صحرایی شده است^[45]. در مطالعه دیگری روی چای سبز نشان داده شده است که عصاره هیدروالکلی این گیاه می‌تواند سبب کاهش درد مزمن در آزمون فرمالین شود، اگر چه این عصاره بر درد ناشی از آزمون صفحه داغ و فاز حاد آزمون فرمالین تأثیری نداشت^[46]. از محدودیت‌های این مطالعه استفاده از یک داروی ضد درد شیمیایی استاندارد مثل مورفین یا ضدالتهاب‌های غیراستروئیدی بود که می‌توانست مقایسه نتایج حاصل از اثرات ضد درد عصاره با آن اطلاعات دقیق‌تری حاصل نماید. لازم به ذکر است که به‌منظور تعیین مکانیزم اثر ضد درد توت سفید پژوهش‌های بیشتری نیاز است. توصیه می‌شود با استفاده از داروهای مهارکننده مسیرهای ایجاد درد، برای مثال داروهای مهارکننده آنزیم سیکلواکسیژناز یا نالوکسان برای مهار عملکرد شبه‌اپیوئیدی، به بررسی اثر ضد درد عصاره الکلی برگ توت پرداخته شود.

نتیجه‌گیری

مصرف خوراکی عصاره الکلی برگ توت سفید باعث کاهش احساس درد در موش‌های صحرایی می‌شود که این اثر ضد درد در دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره بیشتر است.

تشکر و قدردانی: مقاله حاضر حاصل بخشی از نتایج طرح پژوهشی شماره ۹۳۱۷۱ مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کاشان است. لذا بدین وسیله از آن معاونت تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

تاییدیه اخلاقی: تمامی دستورات اخلاقی مصوب کمیته اخلاق معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کاشان در مورد کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد.

تعارض منافع: موردی توسط نویسندگان بیان نشده است.

منابع مالی: این مقاله، بخشی از نتایج طرح پژوهشی شماره ۹۳۱۷۱ مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کاشان است.

منابع

- 1- Blondell RD, Azadfar M, Wisniewski AM. Pharmacologic therapy for acute pain. *Am Fam Physician*. 2013;87(11):766-72.
- 2- Wong I, St John-Green C, Walker SM. Opioid-sparing effects of perioperative paracetamol and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in children. *Paediatr Anaesth*. 2013;23(6):475-95.
- 3- Harirforoosh S, Asghar W, Jamali F. Adverse effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: an update of

میانجی‌های التهابی از جمله پروستاگلاندین‌ها است. در مطالعه حاضر عصاره برگ توت سفید توانست هر دو نوع درد را کاهش دهد. نیتریک‌اکساید و پروستاگلاندین‌ها از جمله میانجی‌های مهم التهابی هستند که مهار آنزیم‌های سیکلواکسیژناز و نیتریک‌اکسایدستاز سبب کاهش مقادیر نیتریک‌اکساید و پروستاگلاندین‌ها و در نهایت کاهش التهاب و درد می‌شود^[28, 29]. پروستاگلاندین‌ها توسط آنزیم سیکلواکسیژناز ساخته شده و با اثر بر گیرنده‌های مرتبط با G پروتئین‌ها باعث ایجاد درد می‌شوند. ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها می‌توانند باعث کاهش فعالیت و بیان آنزیم‌های سیکلواکسیژناز و نیتریک‌اکسایدستاز شده و از این طریق اثرات ضد درد خود را اعمال کنند^[30, 31]. نشان داده شده است که فلاونوئیدها با تأثیر بر گیرنده‌های N-متیل-D-آسپاراتات (NMDA) سبب کاهش کلسیم درون سلولی و به‌دنبال آن مهار فعالیت آنزیم‌های وابسته به کلسیم، نیتریک‌اکسایدستاز و فسفولیپاز A2 می‌شوند^[32]. پروستاگلاندین E افزایش تحریک‌پذیری عصبی و حساس‌شدن گیرنده‌های درد را سبب می‌شود. مهار پروستاگلاندین E موجب تحریک کمتر گیرنده‌های درد می‌شود. در مطالعه چوبی و هوانگ ثابت شده است که برگ توت سفید می‌تواند نیتریک‌اکساید و پروستاگلاندین E را مهار کند^[17].

برگ توت سفید دارای مقادیر بالای ترکیبات فنولی و فلاونوئید است^[9]. فلاونوئیدها و ترکیبات فنولی از ترکیبات موثر گیاهی هستند که اثر آنتی‌اکسیدانی آنها ثابت شده است^[33]. مطالعات انجام‌شده روی ترکیبات گیاهی دارای فلاونوئید و مواد فنولی نشان داده است که این ترکیبات می‌توانند اثر ضد درد و ضدالتهابی چشمگیری داشته باشند^[34, 35]. برای مثال ثابت شده است اثر ضد درد گیاه شبر قمرز به‌دلیل وجود مقادیر بالای ترکیبات فنولی در آن است^[36]. یا اثرات ضد درد زعفران را به فلاونوئیدهای موجود در آن نسبت می‌دهند. در مطالعه حسین‌زاده و بیونسی نشان داده شده است که عصاره زعفران دارای اثر ضد درد است. در این مطالعه مشخص شده است که زعفران از طریق مهار التهاب موجب کاهش درد شده و از طریق سیستم اعصاب مرکزی (مشابه اپیوئیدها) عمل نمی‌کند. زعفران در آزمون پلاتنار که بررسی‌کننده درد حاد و وابسته به سیستم اعصاب مرکزی است، تأثیر معنی‌داری بر شدت درد نگذاشته و موجب کاهش درد نمی‌شود^[37].

فلاونوئید غالب در برگ توت کلرژنیک‌اسید است^[38]. برگ توت همچنین دارای روتین و به‌میزان کمتری کوئرتستین، ایزو کوئرتستین و آسترگالین است^[39, 40]. اثرات ضد درد کلرژنیک‌اسید، روتین و کوئرتستین در مطالعات مختلف ثابت شده است^[41, 42]. کلرژنیک‌اسید می‌تواند واسطه‌های التهابی از جمله نیتریک‌اکساید و TNF- α (فاکتور نکروزدهنده تومور-آلفا) را مهار کند^[32]. کوئرتستین با کاهش فعالیت و بیان آنزیم‌های سنتزکننده نیتریک‌اکساید و سیکلواکسیژناز موجب کاهش پردردی ناشی از

- spinosa Extracts. Jundishapur J Nat Pharm Prod. 2014;9(3):e13859.
- 22- Bannon AW, Malmberg AB. Models of nociception: hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents. *Curr Protoc Neurosci*; 2007.
- 23- Abbott FV, Melzack R, Samuel C. Morphine analgesia in the tail-flick and formalin pain tests is mediated by different neural systems. *Exp Neurol*. 1982;75(3):644-51.
- 24- Coelho LP, Reis PA, de Castro FL, Gayer CRM, Lopes CdS, Silva MCdCe, et al. Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth. seeds. *J Ethnopharmacol*. 2005;98(1-2):109-16.
- 25- 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(2):161-74.
- 26- Arzi A, Rezaei M, Aghel N, Nouri Mombeyni S. Effect of white mulberry leaves hydro-alcoholic extract on carrageenan-induced inflammation in male rat's hind paw. *Jundishapur Sci Med J*. 2009;8(2):149-56. [Persian]
- 27- de Mesquita Padilha M, Vilela FC, da Silva MJ, dos Santos MH, Alves-da-Silva G, Giusti-Paiva A. Antinociceptive effect of the extract of *Morus nigra* leaves in mice. *J Med Food*. 2009;12(6):1381-5.
- 28- Sakata K, Hirose Y, Qiao Z, Tanaka T, Mori H. Inhibition of inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by flavonoid hesperidin in mouse macrophage cell line. *Cancer Lett*. 2003;199(2):139-45.
- 29- Souto FO, Zarpelon AC, Staurengo-Ferrari L, Fattori V, Casagrande R, Fonseca MJ, et al. Quercetin reduces neutrophil recruitment induced by CXCL8, LTB4, and fMLP: inhibition of actin polymerization. *J Nat Prod*. 2011;74(2):113-8.
- 30- Mann GE, Rowlands DJ, Li FY, de Winter P, Siow RC. Activation of endothelial nitric oxide synthase by dietary isoflavones: Role of NO in Nrf2-mediated antioxidant gene expression. *Cardiovasc Res*. 2007;75(2):261-74.
- 31- Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B, Di Benedetto R, Filesì C, Masella R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann Ist Super Sanita*. 2007;43(4):394-405.
- 32- Hu J, Wang Z, Guo Y-Y, Zhang X-N, Xu Z-H, Liu S-B, et al. A role of periaqueductal grey NR2B-containing NMDA receptor in mediating persistent inflammatory pain. *Mol Pain*. 2009;5:71-6.
- 33- da Silva BP, Bernardo RR, Parente JP. Flavonol glycosides from *Costus spicatus*. *Phytochem*. 2000;53(1):87-92.
- 34- Denny C, Melo PS, Franchin M, Massarioli AP, Bergamaschi KB, de Alencar SM, et al. Guava pomace: a new source of anti-inflammatory and analgesic bioactives. *BMC*. 2013;13:235.
- 35- Krogh R, Kroth R, Berti C, Madeira AO, Souza MM, Cechinel-Filho V, et al. Isolation and identification of compounds with antinociceptive action from *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. *Pharm*. 1999;54(6):464-6.
- 36- Lam AN, Demasi M, James MJ, Husband AJ, Walker C. Effect of red clover isoflavones on cox-2 activity in murine and human monocyte/macrophage cells. *Nutr Cancer*. 2004;49(1):89-93.
- 37- Hosseinzadeh H, Younesi HM. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. *BMC Pharmacol*. 2002;2:7.
- 38- Bagdas D, Cinkilic N, Ozboluk HY, Ozyigit MO, Gurun MS. Antihyperalgesic activity of chlorogenic acid in experimental neuropathic pain. *J Nat Med*. 2013;67(4):698-704.
- gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. *J Pharm Pharm Sci*. 2013;16(5):821-47.
- 4- Roome T, Dar A, Naqvi S, Choudhary MI. Evaluation of antinociceptive effect of *Aegiceras corniculatum* stems extracts and its possible mechanism of action in rodents. *J Ethnopharmacol*. 2011;135(2):351-8.
- 5- Toker G, Kùpeli E, Memisoglu M, Yesilada E. Flavonoids with antinociceptive and anti-inflammatory activities from the leaves of *Tilia argentea* (silver linden). *J Ethnopharmacol*. 2004;95(2-3):393-7.
- 6- Oki T, Kobayashi M, Nakamura T, Okuyama A, Masuda M, Shiratsuchi H, et al. Changes in radical-scavenging activity and components of mulberry fruit during maturation. *J Food Sci*. 2006;71(1):C18-22.
- 7- El-Beshbishy HA, Singab AN, Sinkkonen J, Pihlaja K. Hypolipidemic and antioxidant effects of *Morus alba* L. (Egyptian mulberry) root bark fractions supplementation in cholesterol-fed rats. *Life Sci*. 2006;78(23):2724-33.
- 8- Kim SY, Gao JJ, Lee WC, Ryu KS, Lee KR, Kim YC. Antioxidative flavonoids from the leaves of *Morus alba*. *Arch Pharm Res*. 1999;22(1):81-5.
- 9- Katsube T, Tsurunaga Y, Sugiyama M, Furuno T, Yamasaki Y. Effect of air-drying temperature on antioxidant capacity and stability of polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) leaves. *Food Chem*. 2009;113(4):964-9.
- 10- Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther*. 2002;96(2-3):67-202.
- 11- Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2009;2(5):270-8.
- 12- Sies H, Schewe T, Heiss C, Kelm M. Cocoa polyphenols and inflammatory mediators. *Am J Clin Nutr*. 2005;81(Suppl 1):304S-12S.
- 13- Yoon JH, Baek SJ. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei Med J*. 2005;46(5):585-96.
- 14- Ercisli S, Orhan E. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. *Food Chem*. 2007;103(4):1380-4.
- 15- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*. 1999;64(4):555-9.
- 16- Andallu B, Kumar AV, Varadacharyulu NC. Oxidative stress in streptozocin-diabetic rats: Amelioration by mulberry (*Morus Indica* L.) leaves. *Chin J Integr Med*. 2012;1:1-6.
- 17- Choi EM, Hwang JK. Effects of *Morus alba* leaf extract on the production of nitric oxide, prostaglandin E2 and cytokines in RAW264.7 macrophages. *Fitoterapia*. 2005;76(7-8):608-13.
- 18- Arabshahi-Delouee S, Urooj A. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chem*. 2007;102(4):1233-40.
- 19- Özgenç M, Serçeb S, Kayac C. Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits. *Sci Hortic*. 2009;119(3):275-9.
- 20- de Souza MM, Bittar M, Cechinel-Filho V, Yunes RA, Messana I, Delle Monache F, et al. Antinociceptive properties of morusin, a prenylflavonoid isolated from *Morus nigra* root bark. *Z Naturforsch C*. 2000;55(3-4):256-60.
- 21- Mahboubi M, Taghizadeh M, Kazempour N. Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Pycnocyclus*

- 2008;31(6):713-21.
- 43- Izzi V, Masuelli L, Tresoldi I, Sacchetti P, Modesti A, Galvano F, et al. The effects of dietary flavonoids on the regulation of redox inflammatory networks. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2012;17:2396-418.
- 44- Valerio DA, Georgetti SR, Magro DA, Casagrande R, Cunha TM, Vicentini FT, et al. Quercetin reduces inflammatory pain: inhibition of oxidative stress and cytokine production. *J Nat Prod*. 2009;72(11):1975-9.
- 45- Singal A, Anjaneyulu M, Chopra K. Modulatory role of green tea extract on antinociceptive effect of morphine in diabetic mice. *J Med Food*. 2005;8(3):386-91.
- 46- Ahmadian-Baghbadorani N, Azhdari-Zarmehri H, Puzesh S, Mousavi FS, Rajaei F. Antinociceptive effect of hydroalcoholic extract of green tea in male mice. *Feyz*. 2014;17(6):528-36. [Persian]
- 39- Katsube T, Imawaka N, Kawano Y, Yamazaki Y, Shiwaku K, Yamane Y. Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*Morus alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity. *Food Chem*. 2006;97(1):25-31.
- 40- Khan MA, Rahman AA, Islam S, Khandokhar P, Parvin S, Islam MB, et al. A comparative study on the antioxidant activity of methanolic extracts from different parts of *Morus alba* L. (Moraceae). *BMC Res Notes*. 2013;6(1):24.
- 41- Azevedo MI, Pereira AF, Nogueira RB, Rolim FE, Brito GA, Wong DV, et al. The antioxidant effects of the flavonoids rutin and quercetin inhibit oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy. *Mol Pain*. 2013;9:53.
- 42- Filho AW, Filho VC, Olinger L, de Souza MM. Quercetin: further investigation of its antinociceptive properties and mechanisms of action. *Arch Pharm Res*.