

Research Paper

Effect of six-week endurance exercise and hydroalcoholic extract of *Urtica dioica* on blood glucose level and necrotic cells of the hippocampal CA3 region of Wistar rats in type 1 diabetes model**M. Keshvari¹, M. Rahmati², R. Mirnasouri³, F. Chehelcheraghi⁴**

1. Ph.D. candidate of exercise physiology, Lorestan University
2. Associate Professor of Exercise Physiology, Lorestan University (Corresponding Author)
3. Assistant Professor of Exercise Physiology, Lorestan University
4. Assistant Professor of Anatomical Sciences, Lorestan University Medical of Sciences

Received: 2019/10/27

Accepted: 2020/05/04

Abstract

Due to the antioxidant effect of exercise and *Urtica dioica* (UD), the aim of this study was to evaluate the effects of these interventions on changes in blood glucose and necrotic cells in the CA3 region of the type 1 diabetic rat hippocampus. In this study, 76 Wistar rats were divided into healthy (control, exercise, UD, UD-exercise) and diabetes (control, exercise, UD, UD-exercise) groups. Diabetes was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (45mg/kg) and 48 hours after injection, blood glucose levels above 300mg/dl were the criteria for confirmation of diabetes. After confirmation of diabetes, endurance exercise protocol with moderate-intensity (5days/week) and daily gavage of hydroalcoholic extract of UD was performed at 50 mg/kg for six weeks. 48 hours after the last session, the rats were sacrificed and the hippocampal tissue was extracted and fixed in 10% formalin for staining of crystal violet for necrotic cell count. Data were analyzed using ANOVA and Kruskal-Wallis tests using Bonferroni post hoc test at significance level $\alpha=0.05$. Results showed that six weeks of endurance exercise and consumption of UD extract significantly reduced blood glucose concentration in the diabetic exercise ($p=0.001$), diabetes-UD ($p=0.001$), and diabetes-UD exercise ($p=0.001$) groups compared with the diabetes-control group. In addition, there was a significant difference between the diabetes-UD and diabetes-UD-exercise ($p=0.001$), and diabetes-exercise and diabetes-UD-exercise ($p=0.002$) groups. The interaction between endurance exercise and consumption of UD extract significantly decreased the number of necrotic cells in the diabetes-UD-exercise group compared to the diabetic control group ($p=0.029$). Finally, 6-

1. Email: keshvari_maryam@yahoo.com

2. Email: rahmati.mas@lu.ac.ir

3. Email: dr_mirnasouri@yahoo.com

4. Email: fr.chehelcheraghi@gmail.com

week endurance exercise and consumption of hydroalcoholic extract of UD can have a protective effect on preventing necrosis of CA3 cells of diabetic rat hippocampus.

Keywords: Endurance Exercise, *Urtica Dioica*, Necrotic, Hippocampus, Diabetes

Extended Abstract

Background and Purpose

The hippocampus as one of the most sensitive areas is highly vulnerable to factors such as ischemia, stress, and especially diabetes, during which it undergoes structural, neurophysiological, and molecular changes (1). Tissue damage caused by diabetes can be caused by the interaction of complex pathophysiological processes such as inflammation and oxidative stress (2). Studies have shown that increasing the activity of antioxidant enzymes occurring after exercise has beneficial effects in preventing the neurological complications of diabetes and tissue damage caused by oxidative stress following the disease (3). On the other hand, *Urtica dioica* (UD) is one of the herbal supplements and has antioxidant, blood sugar, anti-inflammatory and anti-lipid effects (4). Due to the antioxidant effect of exercise and UD, the aim of this study was to evaluate the effects of these interventions on changes in blood glucose (BG) and necrotic cells in the CA3 region of the type 1 diabetic rat hippocampus.

Materials and Methods

The experiment was performed on six-week-old male Wistar rats, weighing 232.7 ± 12.42 g. Before starting the experiment, all animals were maintained at the new environmental condition for a period of one week and familiarized with treadmill exercise in the second week (10–15 min, 5–10 m/s, five days/week). In this study, 76 rats were divided into healthy (control, exercise, UD, UD-exercise) and diabetes (control, exercise, UD, UD-exercise) groups. Diabetes was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) (45mg/kg), and 48 hours after injection, BG levels above 300 mg/dl were the criteria for confirmation of diabetes (5). Two weeks after the injection of STZ without any intervention, the rats were kept in the laboratory. Then, endurance exercise protocol with moderate-intensity (5days/week) was performed for six weeks. The speed and duration of the treadmill exercise were gradually increased from 10 m/min for 10 minutes in the first week to 10 m/min for 20 minutes in the second week, 14–15 m/min for 20 minutes in the third week, 14–15 m/min for 30 minutes in the fourth week, and 17–18 m/min for 30 minutes for the fifth and sixth weeks. To achieve adaptation in training, the intensity (speed and time) of treadmill exercise was kept constant during the sixth week (5). The UD extract was prepared with 70% ethanol and 30% water. After preparing the extract, the antioxidant activity of the extract was evaluated using stable DPPH radicals. Daily gavage of hydro-alcoholic extract of

UD was performed at 50 mg/kg for six weeks (6). 48 hours after the last session, the rats were sacrificed, and the hippocampal tissue was extracted and fixed in 10% formalin for staining of crystal violet for necrotic cell count of CA3 area. Data were analyzed using ANOVA and Kruskal-Wallis tests using Bonferroni post hoc test at significance level $\alpha=0.05$.

Results

Measurement of antioxidant activity of UD hydroalcoholic extract by DPPH method: In measuring the antioxidant activity by DPPH method, the IC₅₀ of UD extract was 295 $\mu\text{g/ml}$ and ascorbic acid was 23 $\mu\text{g/ml}$.

Endurance training and UD hydro-alcoholic extract reduced BG in diabetic rats. At the beginning of the research, the mean BG in all groups was 106 ± 2.58 mg/dl ($P=0.570$). Then, BG increased significantly after 48 hours of STZ injections in rats of diabetes groups compared to the healthy control group ($P=0.001$), and the mean BG in diabetic groups was 498.07 ± 42.06 mg/dl, demonstrating that diabetes induction was successful. The results of the analysis of variance with repeated measures showed that endurance training and hydro-alcoholic extract of UD plant significantly reduced BG of the rats in diabetes-exercise groups from the fourth week ($p=0.03$), diabetes-UD from the third week ($p=0.04$), and diabetes-UD-exercise from the second week ($p=0.02$) compared with after STZ injection. At the end of the sixth week of the study, endurance exercise and consumption of UD extract significantly reduced BG concentration in the diabetic exercise ($p=0.001$), diabetes-UD ($p=0.001$), and diabetes-UD-exercise ($p=0.001$) groups compared with the diabetes-control group. In addition, there was a significant difference between the diabetes-UD and diabetes-UD-exercise ($p=0.001$), and diabetes-exercise and diabetes-UD-exercise ($p=0.002$) groups.

Endurance training and UD hydro-alcoholic extract reduced necrosis of CA3 hippocampal neurons in diabetic rats. The results of the Kruskal-Wallis test showed that there was a significant difference between the groups studied in the number of necrotic cells in the CA3 area of the hippocampus ($p=0.001$). Comparison of groups using the modified Bonferroni test showed that the diabetes-control group had significantly more necrotic cells than the healthy control group ($p=0.016$). Six weeks of endurance exercise and UD extract consumption reduced the number of necrotic cells in the CA3 hippocampal region of the diabetes-UD-exercise group compared to the diabetes-control group ($p=0.029$). The reduction in the number of necrotic cells in the diabetes-exercise ($p=1.000$) and diabetes-UD ($p=1.000$) groups was not significant compared to the diabetes-control group. Also, there was no significant difference between diabetes-exercise with diabetes-UD ($p=1.000$), diabetes-exercise with diabetes-UD-exercise ($p=1.000$) and diabetes-UD with diabetes-UD-exercise ($p=1.000$). In

addition, there was no difference between healthy-control, healthy-exercise, healthy-UD and healthy-UD-exercise groups in the number of necrotic cells. Comparison of healthy and diabetic groups showed that there was a significant difference between diabetes-UD ($p=0.015$) and diabetes-exercise ($p=0.017$) groups with healthy UD-exercise group. There was no difference between diabetes-UD-exercise and healthy-UD-exercise groups ($p=0.678$).

Conclusion

Diabetes increases neurological vulnerability to stressors (1, 2). Most likely, UD extract, by its antioxidant properties and free radical scavenging, regenerates the pancreatic beta, thereby reducing the BG levels of diabetic rats (4). In addition, reducing cellular stress through UD improved and prevented the death of hippocampal pyramidal cells. On the other hand, regular exercise improves metabolic control in animals and diabetic humans (7), and by increasing antioxidant defenses, it reduces oxidative stress and reduces the effects of diabetes, including reducing neuronal mortality (8). According to the results of the present study, the beneficial effects of UD extract consumption and exercise on molecular and tissue aspects in diabetic patients, it is likely that exercise with UD extract will improve and further increase the positive aspects compared to the single effects of these interventions on cell death pathways, and can have protective effects on preventing necrosis of CA3 cells of diabetic rat hippocampus.

Article Message

According to the results of the present study, it seems that endurance training and consumption of hydroalcoholic extract of UD together can create better protective effects against necrosis of hippocampal nerve cells.

Keywords: Endurance exercise, *Urtica dioica*, Necrotic, Hippocampus, Diabetes

References

1. Beauquis J, Saravia F, Coulaud J, Roig P, Dardenne M, Homo-Delarche F, et al. Prominently decreased hippocampal neurogenesis in a spontaneous model of type 1 diabetes, the nonobese diabetic mouse. *Experimental neurology*. 2008;210(2):359-67.
2. Oguntibeju OO. Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links. *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology*. 2019;11(3):45-63.
3. Shamsaei N, Abdi H, Shamsi M. The Effect of a continuous training on necrosis and apoptosis changes in the hippocampus of diabetic rats. *SJIMU*. 2017;25(1):1-11.

4. Golalipour MJ, Khori V. The protective activity of *Urtica dioica* leaves on blood glucose concentration and beta-cells in streptozotocin-diabetic rats. *PJBS* 2007;10(8):1200-4.
5. Rahmati M, Gharakhanlou R, Movahedin M, Mowla SJ, Khazani A, Fouladvand M, et al. Treadmill Training Modifies KIF5B Motor Protein in the STZ-induced Diabetic Rat Spinal Cord and Sciatic Nerve. *AIM*. 2015;18(2):94-101.
6. Patel SS, Gupta S, Udayabanu M. *Urtica dioica* modulates hippocampal insulin signaling and recognition memory deficit in streptozotocin induced diabetic mice. *Metabolic brain disease*. 2016;31(3):601-11.
7. Gomes R, de Mello M, Caetano F, Sibuya C, Anaruma CA, Rogatto G, et al. Effects of swimming training on bone mass and the GH/IGF-1 axis in diabetic rats. *Growth Hormone & IGF Research*. 2006;16(5-6):326-31.
8. Atalay M, Laaksonen DE. Diabetes, oxidative stress and physical exercise. *JSSM*. 2002;1(1):1-14.

اثر شش هفته تمرین استقامتی و عصاره هیدروالکلی گزنه بر سطح قندخون و سلول‌های نکروتیک ناحیه CA3 هیپوکامپ موش‌های صحرایی نژاد ویستار در مدل دیابت نوع یک

مریم کشوری^۱، مسعود رحمتی^۲، رحیم میرنصوری^۳، فرزانه چهل چراغی^۴

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه لرستان

۲. دانشیار فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه لرستان (نویسنده مسئول)

۳. استادیار فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه لرستان

۴. استادیار علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۸/۰۵

چکیده

با توجه به اثر آنتی‌اکسیدانی ورزش و گیاه گزنه، هدف این مطالعه بررسی شش هفته‌ای این مداخلات بر تغییرات قندخون و سلول‌های نکروتیک در ناحیه CA3 هیپوکامپ موش‌های دیابتی نوع یک بود. در این مطالعه ۷۶ سر موش نژاد ویستار به گروه‌های سالم (کنترل، تمرین، گزنه و تمرین-گزنه) و دیابت (کنترل، تمرین، گزنه و تمرین-گزنه) تقسیم شدند. دیابت با تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین (۴۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) القا شد و ۴۸ ساعت پس از تزریق، قندخون بیشتر از ۳۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر ملاک تأیید دیابت بود. پس از تأیید شدن دیابت، پروتکل تمرین استقامتی با شدت متوسط (پنج روز/هفته) و گاواژ روزانه عصاره هیدروالکلی گزنه به مقدار ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، به مدت شش هفته اجرا شد. چهل و هشت ساعت پس از آخرین جلسه، موش‌ها قربانی شدند و بافت هیپوکامپ خارج شد و سپس در فرمالین ۱۰ درصد برای رنگ آمیزی کریزیل و یوله برای شمارش سلول‌های نکروتیک قرار داده شدند. داده‌ها با آزمون‌های آنالیز واریانس آنوا و کروسکال والیس و با استفاده از آزمون تعقیبی بونفرونی در سطح معناداری ($\alpha = 0.05$) تجزیه و تحلیل شدند. یافته‌ها نشان داد که شش هفته تمرین استقامتی و مصرف عصاره گزنه سبب کاهش معنادار غلظت قندخون گروه‌های دیابت-تمرین ($P = 0.001$)، دیابت-گزنه ($P = 0.001$) و دیابت-تمرین-گزنه ($P = 0.001$) در مقایسه با گروه دیابت-کنترل شد. به علاوه بین گروه‌های دیابت-گزنه و دیابت-تمرین-گزنه ($P = 0.001$) و دیابت-گزنه با دیابت-تمرین ($P = 0.002$) تفاوت معنادار مشاهده شد. همچنین تعامل

1. Email: keshvari_maryam@yahoo.com

2. Email: rahmati.mas@lu.ac.ir

3. Email: dr_mirnasuri@yahoo.com

4. Email: fr.chehelcheraghi@gmail.com

تمرین استقامتی و مصرف عصاره گزنه باعث کاهش معنادار تعداد سلول‌های نکروتیک در گروه دیابت-تمرین-گزنه در مقایسه با گروه دیابت-کنترل شد ($P = 0.029$); در نتیجه شش هفته تمرین استقامتی و مصرف عصاره هیدروالکلی گزنه می‌تواند اثر محافظتی بر جلوگیری از نکروز شدن سلول‌های منطقه CA3 هیپوکامپ موش دیابتی داشته باشد.

واژگان کلیدی: تمرین استقامتی، گزنه، نکروتیک، هیپوکامپ، دیابت.

مقدمه

دیابت، بیماری غدد درون‌ریز است که با عوارض نورولوژیک گوناگون در سیستم عصبی همراه است و موجب تغییرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در سلول‌های عصبی می‌شود (۱). از میان مناطق مغزی، هیپوکامپ یکی از حساس‌ترین نواحی است که در مقابل فاکتورهای مضر و آسیب‌پذیر مانند ایسکمی، استرس و به‌ویژه دیابت بسیار آسیب‌پذیر است و در طی آن دستخوش تغییرات ساختاری، نوروفیزیولوژیک و مولکولی همچون آتروفی هیپوکامپ (۲)، کاهش نورونز (۳)، کاهش انشعابات دندریتی (۴)، تغییرات آستروگلیالی (۵)، تغییر در رسپتورهای گلوتاماتی (۶)، رسپتورهای انسولینی و فاکتورهای رشد شبه‌انسولینی (۷)، رسپتورهای دوپامینی (۸)، رسپتورهای محصولات نهایی گلیکوزیلاسیون پیشرفته (۹) و نیز تغییر در بیان ژن‌هایی از جمله نیتریک اکساید سنتاز، فاکتور رونویسی NF-kB (۱۰) و فاکتور رشد عصبی (۱۱) می‌شود. از دیگر تغییرات درخور توجه ناشی از دیابت می‌توان به مرگ نورونی در هیپوکامپ اشاره کرد (۱۲).

هیپوکامپ دارای بخش‌های مختلفی شامل CA1، CA2، CA3، CA4 سوبیکولوم و شکنج دندان‌های است که ناحیه CA3 هیپوکامپ به‌دلیل سیناپس‌ها و تحریکات مکرر با سایر بخش‌های هیپوکامپ، نقش اساسی در تکمیل الگوی سوبسترای زیرسلولی هیپوکامپ دارد و نقش مهمی در یادگیری و حافظه ایفا می‌کند (۱۳). هیپرگلیسمی از طریق تغییر در هموستاز کلسیم، فعالیت پروتئین کینازها، افزایش تولید ROS و استرس اکسیداتیو نقش عمده‌ای در القای دژنراسیون نورونی در بیماری دیابت ایفا می‌کند (۱۲). گونه‌های فعال اکسیژن می‌توانند به پیشرفت استرس اکسیداتیو در بدن و در نتیجه مرگ نورونی منجر شوند که موجب نوروپاتولوژی مرتبط با دیابت می‌شود (۱۴). همچنین آسیب‌های بافتی ناشی از دیابت می‌تواند در نتیجه تعامل فرایندهای پیچیده پاتوفیزیولوژیک مانند التهاب و استرس اکسیداتیو ایجاد شود (۱۵). مطالعات نشان داده‌اند که افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش سطح پراکسیداسیون لیپیدی که به‌دنبال فعالیت ورزشی رخ می‌دهد، دارای اثرات مفیدی بر جلوگیری از عوارض عصبی ناشی از دیابت و آسیب‌های بافتی ایجادشده در اثر استرس اکسیداتیو

به دنبال این بیماری است (۱۶)؛ به طوری که مطالعات انسانی و سایر حیوانات نشان می‌دهند که ورزش بسیاری از جنبه‌های عملکرد مغز و اثرات جانبی بر سلامت کلی مغز را هدف قرار می‌دهد. مزایای ورزش برای یادگیری و حافظه، محافظت در برابر تخریب عصبی و کاهش افسردگی به بهترین وجه تعریف شده است. تمرین ورزشی با تأثیر مستقیم بر ساختار سیناپس، تقویت قدرت سیناپسی و تقویت سیستم سلولی که از قابلیت انعطاف‌پذیری از جمله نورونز، متابولیسم و عملکرد عروقی پشتیبانی می‌کند، باعث افزایش قابلیت انعطاف‌پذیری سیناپسی می‌شود. چنین تغییر ساختاری و عملکردی ناشی از ورزش در مناطق مختلف مغزی از جمله هیپوکامپ ثبت شده است (۱۷). ورزش می‌تواند نورونز، تکثیر سلولی، تقویت طولانی مدت (LTP) و انعطاف‌پذیری سیناپسی را در هیپوکامپ بهبود بخشد. علاوه بر موارد ذکر شده، ورزش باعث افزایش بیان عوامل عصبی مثل فاکتور نوروتروفیک مشتق شده از مغز (BDNF) می‌شود و از استرس اکسیداتیو جلوگیری می‌کند. در مقابل، هایپرگلیسمی مرتبط با دیابت باعث کاهش نورونز می‌شود و استرس اکسیداتیو و مرگ عصبی را افزایش می‌دهد (۱۸). در دهه‌های اخیر انجام دادن فعالیت ورزشی به تنهایی یا همراه با رژیم غذایی و دارو به عنوان راهکاری قوی برای مدیریت و کنترل دیابت توصیه شده است (۱۹). فعالیت ورزشی به واسطه خواص چندگانه می‌تواند حداقل به کاهش استفاده از داروهای ضد دیابتی و تقلیل اثرات جانبی آن‌ها در افراد دیابتی منجر شود (۲۰). شواهد نشان می‌دهند که فعالیت ورزشی بر جنبه‌های گوناگونی از فعالیت سلول‌های عصبی تأثیر می‌گذارد و ممکن است از مرگ سلول‌های عصبی جلوگیری کند (۲۱). اعتقاد بر این است که فعالیت ورزشی منظم باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، افزایش مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو و در نتیجه کاهش آسیب اکسیداتیو می‌شود (۲۲).

در مجموع به نظر می‌رسد تمرین‌های ورزشی بتوانند با فعال‌سازی مسیرهای عصب‌زایی و غیرفعال کردن مسیرهای تحلیل عصبی در بافت هیپوکامپ بیماران دیابتی، از طریق افزایش عوامل رشدی و محافظتی و کاهش عوامل التهابی به این بیماران کمک کنند. از سوی دیگر، گیاه گزنه با نام علمی اورتیکا دیوئیکا^۱، یکی از مکمل‌های گیاهی است که اثراتی مانند کاهندگی قندخون، ضدالتهاب و ضدلیپیدی دارد (۲۳). گزنه گیاهی پایا متعلق به خانواده اورتیکاسیس^۲ است که با کرک‌های گزنده مشخص می‌شود و به دلیل مصارف طولانی مدتشان، گیاه دارویی در سطح جهان شناخته شده است (۲۴).

کارواکرو^۳ یکی از مواد تشکیل‌دهنده گزنه است که اثر محافظت نوروئی در برابر آسیب ایسکمی مغزی کانونی/مجدد جریان خون دارد و سطح دوپامین و سروتونین را در قشر جلوی مغز و هیپوکامپ

-
1. *Urtica dioica*
 2. *Urticaceae*
 3. *Carvacrol*

تنظیم می‌کند. از دیگر ترکیبات مؤثر گیاه گزنه، اسکوپولتین^۱ است که به‌عنوان تقویت رهایش استیل کولین از سیناپتوزوم‌ها شناخته شده است و تقویت طولانی‌مدت هیپوکامپ را افزایش می‌دهد و اختلال در حافظه را بهبود می‌بخشد. این روند، بیان ژن گیرنده فعال شده با پرولیفرایمر پراکسیزوم (PPAR- γ) را افزایش می‌دهد و مقاومت به انسولین را در سلول‌های HepG2 بهبود می‌بخشد. PPARها برای تنظیم آنژیوژنز و تمایز سلول‌های شوآن شناخته شده‌اند که نقش مهمی در آسیب و احیای عصب محیطی دارند. همچنین گزنه منبع غنی 5-HT^۲ است که به‌دلیل ارتباط آن با ترشح انسولین و عملکردهای حافظه شناخته شده است (۲۵).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی گزنه به‌دلیل داشتن فلاونوئید است. از آنجاکه استرس اکسیداتیو یکی از سازوکارهای پاتوفیزیولوژیک در پیشرفت تغییرات ساختاری و عملکردی نورونی است (۱۴)، به نظر می‌رسد گزنه در کنترل تغییرات ساختاری نورون‌های بافت هیپوکامپ تأثیر داشته باشد. همه این ویژگی‌ها باعث می‌شود که گزنه کاندیدای ایده‌آلی برای درمان دیابت و عوارض مرتبط با آن مانند اختلال در حافظه و نوروپاتی مرکزی باشد که تاکنون پژوهش‌های اندکی انجام شده است. همچنین تاکنون مطالعه‌ای تأثیر هم‌زمان تمرین ورزشی و مصرف عصاره گزنه بر مرگ نورون‌ها در بافت هیپوکامپ را بررسی نکرده است. همچنین با توجه به اینکه در سال‌های اخیر به منطقه CA3 به‌دلیل نقش خاص آن در فرایندهای حافظه، حساسیت به تشنج و تخریب عصبی توجه جدی نشده است، این منطقه درخور بررسی بود. همچنین اتصال داخلی در زیرمجموعه CA3 از سایر مناطق هیپوکامپ غنی‌تر است و آکسون‌های زیاد و پیچیده سلول‌های هرمی منطقه CA3 باعث ایجاد تماس‌های تحریک‌آمیز با نورون‌های تحریکی و مهاری همسایگان می‌شوند. این مدارها در رمزگذاری نمایش‌های مکانی و خاطرات اپیزودیک نقش دارند. منطقه CA3 هیپوکامپ شامل یک مدار تحریکی مکرر است که تصور می‌شود برای تولید انجمن در بین اطلاعات ذخیره‌شده در یک ناحیه مغز مهم است.

به‌علاوه، مطالعه حاضر در سطح بافت‌شناسی انجام شده است و منطقه CA3 دارای نورون‌های هرمی بزرگ‌تر و درشت‌تر است؛ بنابراین پارامترهای بافت‌شناسی قابلیت تفسیر بیشتری دارند (۲۶، ۲۷). به‌هرحال، با توجه به اثرات مفید تمرین ورزشی و گیاه گزنه بر سیستم مرکزی، این مطالعه با هدف بررسی تأثیر شش هفته تمرین استقامتی همراه با مصرف عصاره هیدروالکلی گیاه گزنه به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان بر تغییرات قندخون و مرگ نورون‌های منطقه CA3 بافت هیپوکامپ در موش‌های دیابتی نوع یک انجام شده است.

-
1. Scopoletin
 2. 5-Hydroxy Tryptamine (5-HT)

روش پژوهش

پژوهش حاضر از نوع تجربی، بنیادی و کاربردی بود که به شیوه آزمایشگاهی انجام شد. موش‌های صحرایی شش‌هفته‌ای نر نژاد ویستار با وزن $12/42 \pm 232/7$ گرم به‌عنوان نمونه پژوهش از مرکز نگهداری حیوانات دانشگاه علوم پزشکی لرستان به‌طور تصادفی خریداری شدند. پس از انتقال نمونه‌ها به محیط آزمایشگاه مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی دانشگاه علوم پزشکی لرستان، به‌مدت یک هفته برای سازگاری با شرایط جدید، حیوانات در محیط استاندارد در اتاقی با چرخه ۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی، دمای 1 ± 25 درجه سانتی‌گراد با دسترسی آزاد به آب و غذا (به‌صورت پنج‌تایی در قفس‌های شفاف پلی‌کربنات) نگهداری شدند. در هفته دوم، مرحله آشناسازی با نحوه فعالیت حیوانات روی نوارگردان (پنج جلسه/۱۰ تا ۱۵ دقیقه/سرعت ۱۰ تا ۲۰ متر بر دقیقه) اجرا شد. برای تحریک به دویدن و جلوگیری از اثر احتمالی شوک الکتریکی بر یافته‌های پژوهش، در مرحله آشنا-ساز حیوانات با فعالیت روی نوارگردان به روش شرطی‌سازی با صدا آموزش داده شد تا از نزدیک شدن و استراحت در بخش انتهایی دستگاه خودداری کنند (۲۸). پس از مراحل آشناسازی با محیط و نوارگردان، ۷۶ سر موش نر از نژاد ویستار به‌طور تصادفی به گروه‌های سالم (کنترل، تمرین، گزنه، تمرین-گزنه) و دیابت (کنترل، تمرین، گزنه، تمرین-گزنه) تقسیم شدند. تعداد نمونه حیوانی در گروه‌های دیابتی ۱۰ سر و در گروه‌های سالم ۱۰ سر موش بود.

القای دیابت: پس از اتمام پروتکل آشناسازی و پس از ۱۲ ساعت محرومیت از غذا، القای دیابت نوع یک با تزریق داخل صفاقی محلول استرپتوزتوسین^۱ (۴۵ میلی‌گرم/کیلوگرم STZ) (ساخت سیگمای آمریکا) حل‌شده در بافر سیترات تازه (0.05 mol/L، PH 4.5) دیابت القا شد و به موش‌های غیردیابتی نیز معادل حجمی بافر سیترات تزریق شد (۲۹). چهل‌وهشت ساعت پس از تزریق، با ایجاد یک جراحی کوچک توسط لانسست روی ورید دم حیوان، یک قطره خون روی نوار گلوکومتری قرار داده شد (امپور، ساخت کره جنوبی) و قندخون اندازه‌گیری شد. موش‌های صحرایی که قندخون آن‌ها بیشتر از ۳۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر بود، موش دیابتی در نظر گرفته شدند. برای اطمینان از فقدان بازگشت قندخون در پایان هفته، قندخون موش‌های دیابتی دوباره اندازه‌گیری شد. دو هفته پس از تزریق استرپتوزتوسین، موش‌ها بدون هیچ مداخله‌ای در آزمایشگاه نگهداری شدند. قندخون موش‌های گروه‌های مطالعه‌شده به‌صورت هفتگی تا پایان پژوهش اندازه‌گیری شد.

جمع‌آوری گیاه، آماده‌سازی عصاره، سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مقدار مصرف: پس از شناسایی گیاه گزنه، جمع‌آوری آن از قالی‌کوه، یکی از قله‌های رشته‌کوه زاگرس در استان لرستان، انجام شد. سپس در هر بار یوم سازمان جهاد کشاورزی استان لرستان تأیید شد. اندام‌های هوایی گیاه

1. Streptozotocin (STZ)

گزنه در وضعیت مناسب (تاریک و خشک) نگهداری شدند، به طور کامل خشک شدند و برای عصاره‌گیری آسیاب شدند. برای تهیه عصاره هیدروالکلی گیاه گزنه، ۵۰۰ گرم از پودر خشک‌شده گیاه به اتانول ۷۰ درصد اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. ماده به دست آمده دو بار از کاغذ صافی شماره دوی واتمن عبور داده شد. به منظور کاهش حجم حلال و تبخیر اتانول در دستگاه روتاری در دمای ۶۰ درجه قرار گرفت. پس از آن عصاره به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۶۰ درجه قرار گرفت تا اتانول آن کاملاً تبخیر شود و عصاره خشک گیاه به دست آید و تا زمان آزمایش در یخچال نگهداری شد (۳۰). پس از عصاره‌گیری، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره با استفاده از رادیکال‌های پایدار DPPH^۱ ارزیابی شد. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره و آسکوربیک اسید در غلظت‌های مختلف به چهار میلی‌لیتر از محلول متانولی تازه‌تهیه‌شده DPPH (۱۰ × ۶ مولار) افزوده شد و یک نمونه حاوی ۲۰۰ میکرولیتر متانولی و چهار میلی‌لیتر محلول DPPH به عنوان کنترل استفاده شد و بعد از ۳۰ دقیقه نگهداری در حرارت اتاق و تاریکی، جذب محلول‌ها و کنترل در طول موج ۵۱۱nm یادداشت شد. میزان فعالیت گیرندگی رادیکال آزاد عصاره با استفاده از فرمول $(A_{control} - A_{sample}) / A_{control} \times 100$ محاسبه شد که در آن $A_{control}$ جذب DPPH و A_{sample} جذب DPPH در حضور نمونه است. نتایج با اسید آسکوربیک به عنوان استاندارد مقایسه شد. فعالیت ضدرادیکالی در مقابل غلظت‌های مختلف نمونه با ترکیب مرجع نمایش داده شد و IC_{50} آن محاسبه شد. این مقدار محاسبه‌شده نشان‌دهنده غلظت‌های مورد نیاز برای مهار ۵۰ درصد از رادیکال‌های DPPH است (۳۱). سپس گروه‌های دیابت-گزنه، دیابت-تمرین-گزنه، سالم-گزنه و سالم-تمرین-گزنه با شروع پروتکل تمرین استقامتی، عصاره هیدروالکلی گزنه را با دوز ۵۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن (میزان ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم از عصاره خشک گیاه در یک میلی‌لیتر آب مقطر حل شد) به صورت روزانه و خوراکی (گاواژ) به مدت شش هفته دریافت کردند. برای از بین بردن تفاوت بین گروه‌ها، حجم معینی از آب مقطر به گروه‌های بدون گزنه گاواژ شد (۳۲).

پروتکل تمرین استقامتی: برای تمرین استقامتی از شدت تمرینی متوسط استفاده شد؛ بدین صورت که گروه‌های ورزشی در معرض تمرین نوارگردان (نوارگردان حیوانی آذرخش، شرکت مهندسی فناوری پیشرو اندیشه، تهران، ایران) برای پنج جلسه در هفته و به مدت شش هفته قرار گرفتند. سرعت و مدت تمرین نوارگردان به تدریج افزایش یافت و از ۱۰ متر در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در هفته اول شروع شد. سپس در هفته دوم ۱۰ متر در دقیقه برای ۲۰ دقیقه، ۱۵ متر در دقیقه برای ۲۰ دقیقه در هفته سوم، ۱۵ متر در دقیقه برای ۳۰ دقیقه در هفته چهارم و ۱۸ متر در

1. α, α -Diphenyl- β -Picrylhydrazyl (DPPH)

دقیقه برای ۳۰ دقیقه در هفته پنجم افزایش یافت. به منظور رسیدن سازگاری‌های به دست آمده به حالت یکنواخت، تمامی متغیرهای تمرینی در هفته پایانی (هفته ششم) ثابت نگهداشته شدند (۲۹).
روش مطالعه بافتی: چهل و هشت ساعت پس از آخرین جلسه تمرین استقامتی و دریافت عصاره هیدروالکلی گزنه، تمامی موش‌ها با استنشاق دو درصد هالوتان در مخلوطی از ۳۰ درصد O₂ و ۷۰ درصد N₂O بی‌هوش شدند و با ۱۰۰ میلی‌لیتر نرمال سالین و به دنبال آن ۲۵۰ میلی‌لیتر پارفورمالدئید ۴ درصد در بافر فسفات ۰/۱ میلی‌گرم (pH 7.4) پرفیوژن شدند (۳۳). بعد از اتمام پرفیوژن، سر حیوانات جدا شد و مغز آن‌ها با دقت خارج شد و تا زمان انجام شدن فرایند بافت‌شناسی به محلول تثبیت‌کننده منتقل شدند. پس از انجام شدن مراحل آب‌گیری، شفاف‌سازی و قالب‌گیری، با استفاده از میکروتوم برش‌های متوالی (سریال) کروئال به ضخامت پنج میکرومتر از Leica RM2135 ناحیه CA3 هیپوکامپ نیمکره راست با توجه به اطلس Paxinos برای تهیه بلوک‌های پارافینی آماده شد. برش‌ها روی لام قرار گرفتند. سپس لام‌ها با محلول کریزل ویوله یک درصد به مدت ۲۰ دقیقه رنگ-آمیزی شدند و پس از آن پنج دقیقه در آب جاری شست‌وشو انجام شد. سپس مرحله آب‌گیری با الکل ۱۰۰ درصد در دو مرحله یک دقیقه‌ای و مرحله شفاف‌سازی در دو مرحله پنج دقیقه‌ای با گزبل انجام شد. پس از انجام شدن مراحل ذکر شده، قطره‌ای چسب روی لام مدنظر ریخته شد و پس از قراردادن لام روی آن در دمای اتاق قرار گرفت تا خشک شد. رنگ‌آمیزی کریزل ویوله، اجسام نیسل سلول‌های عصبی را به رنگ آبی-بنفش نشان می‌دهد (۳۴). پس از رنگ‌آمیزی، شمارش هر مقطع در سه برش با حداقل فاصله ۵۰ میکرومتر انجام شد. برای شمارش نورون‌ها در هر گروه سطحی برابر با ۱۳۵۰ میکرومتر مربع در نظر گرفته شد. چروکیدگی سلول، از دست رفتن یکنواختی اجسام نیسل، تراکم سیتوپلاسم و هسته و پیکنوزه شدن هسته توسط میکروسکوپ نوری OLYMPUS, AX70 با بزرگ‌نمایی 40X بررسی شد (۳۵).

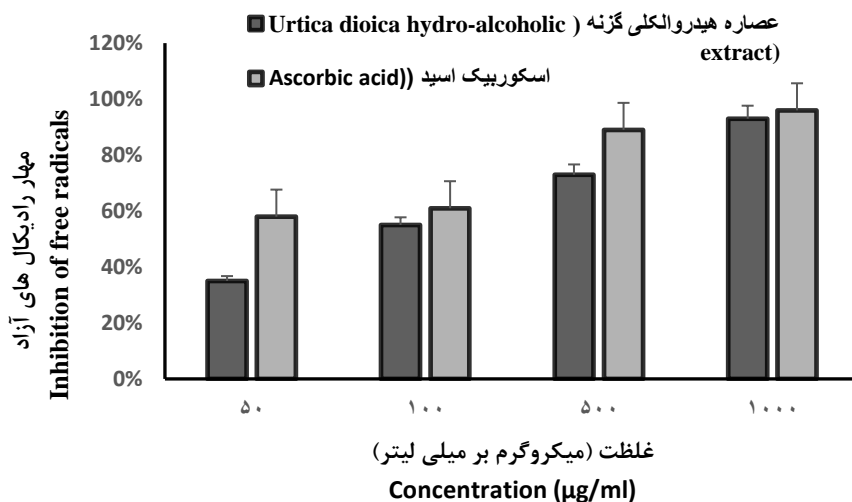
روش‌های آماری: پس از جمع‌آوری داده‌ها از آمار توصیفی و استنباطی استفاده شد. در آمار استنباطی از آزمون‌های شاپیرو-ویلک^۱ به منظور بررسی توزیع طبیعی داده‌ها استفاده شد. از آزمون‌های تحلیل واریانس با اندازه‌های تکراری^۲ برای بررسی تفاوت معناداری میانگین‌های درون‌گروهی و بین‌گروهی (آزمون تعقیبی بونفرونی) استفاده شد. همچنین از آزمون کروسکال والیس (آزمون تعقیبی اصلاح‌شده بونفرونی) به منظور بررسی تفاوت معناداری میانگین‌های بین‌گروه‌ها در شمارش سلول‌های نکروتیک در منطقه CA3 هیپوکامپ استفاده شد. همه نتایج به صورت میانگین \pm

1. Shapiro-Wilk
 2. ANOVA With Repeated Measure

انحراف معیار نشان داده شده است و مقدار $\alpha = 0.05$ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها در محیط نرم‌افزار اس.پی.اس.اس. نسخه ۲۲ انجام شد. **ملاحظات اخلاقی:** مراحل پژوهش حاضر براساس راهنمایی شورای پژوهش ملی برای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام گرفت و تلاش بر این بود که هرگونه استرس غیرضروری به حیوانات حذف شود. پروتکل این مطالعه در کمیته اخلاق در پژوهش دانشکده دامپزشکی دانشگاه لرستان با کد LU. ECRA. 2018.16 تأیید شد و تمام تلاش‌ها برای به حداقل رساندن درد و کاهش تعداد حیوانات مورد نیاز بود.

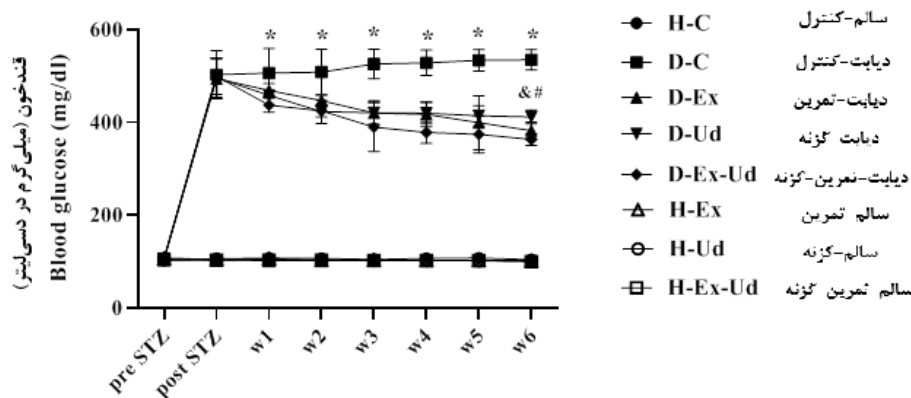
نتایج

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره هیدروالکلی گزنه به روش DPPH: در سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی IC_{50} برابر با ۲۹۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر را نشان داد؛ در حالی که برای اسکوربیک اسید ۲۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین درصد به‌دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد عصاره هیدروالکلی گزنه، ارتباط معناداری را در غلظت‌های مختلف از خود نشان داد (شکل شماره یک).



شکل ۱- درصد مهار رادیکال‌های آزاد در غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی گزنه و اسکوربیک اسید
Figure 1- Percentage of free radicals inhibition in different concentrations of hydro-alcoholic extract of Urtica dioica extract and ascorbic acid.

تمرین استقامتی و عصاره هیدروالکلی گزنه سبب کاهش قندخون در موش‌های دیابتی شد: در ابتدای پژوهش میانگین قندخون موش‌های بررسی‌شده برابر با $2/58 \pm 106$ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بود که ۴۸ ساعت پس از القای دیابت به‌وسیله تزریق درون‌صفاقی STZ، سطح قندخون موش‌های گروه‌های دیابتی به‌طور معناداری افزایش یافت؛ به‌طوری‌که میانگین قندخون گروه‌های دیابتی برابر با $42/06 \pm 498/07$ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر شد و این مقدار در مقایسه با میزان قندخون موش‌های گروه سالم-کنترل تفاوت معنادار داشت ($P = 0.001$) و دیابتی شدن موش‌ها را در گروه‌های دیابتی تأیید کرد. نتایج آزمون تحلیل واریانس با اندازه‌های تکراری نشان داد که تمرین استقامتی و عصاره هیدروالکلی گیاه گزنه در گروه دیابت-تمرین از هفته چهارم ($P = 0.03$)، گروه دیابت-گزنه از هفته سوم ($P = 0.04$) و گروه دیابت-تمرین-گزنه از هفته دوم ($P = 0.02$) اجرای پروتکل پژوهش، باعث کاهش معنادار قندخون موش‌های این گروه‌ها در مقایسه با مرحله بعد از تزریق STZ شد و این کاهش تا پایان پروتکل ادامه داشت؛ به‌طوری‌که در پایان هفته ششم اجرای پروتکل پژوهش، غلظت قندخون گروه دیابت-تمرین با میانگین $17/92 \pm 382/14$ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر ($P = 0.001$)، گروه دیابت-گزنه با میانگین $15/15 \pm 411/57$ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر ($P = 0.001$) و گروه دیابت-تمرین-گزنه با میانگین $42/60 \pm 363/12$ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر ($P = 0.001$) در مقایسه با گروه دیابت-کنترل با میانگین $22/18 \pm 534/85$ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر به‌صورت معناداری کمتر بود. همچنین در هفته ششم بین گروه‌های دیابت-گزنه و دیابت-تمرین-گزنه ($P = 0.001$) و گروه‌های دیابت-گزنه با دیابت-تمرین ($P = 0.002$) تفاوت معنادار وجود داشت (شکل شماره دو).



شکل ۲- مقادیر گلوکز خون در طی اجرای پروتکل پژوهش

* : تفاوت معنادار بین گروه دیابت-کنترل با سایر گروه‌ها ($P = 0.001$)، &: تفاوت گروه دیابت-گزنه با گروه

دیابت-تمرین-گزنه ($P = 0.001$)، #: تفاوت گروه دیابت-گزنه با گروه دیابت-تمرین ($P = 0.002$)

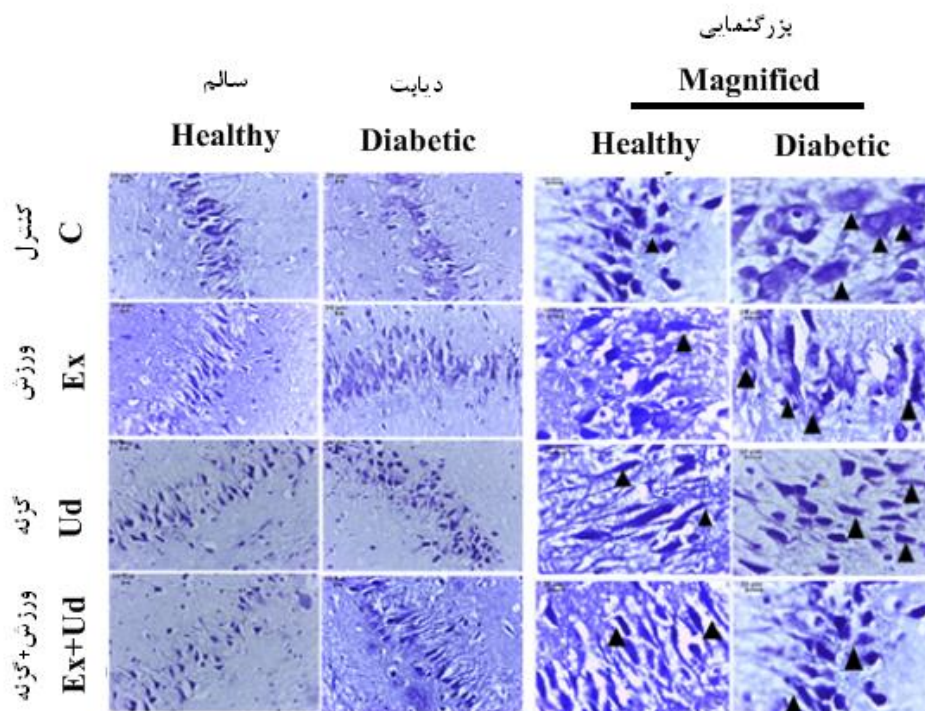
Figure 2- Blood glucose levels during the implementation of the research protocol. *

Significant difference between D-C group with other groups ($p = 0.001$), & difference between D-Ud group with D-Ex-Ud ($p = 0.001$), #group difference D-Ud with D-Ex ($p = 0.002$).

تمرین استقامتی و عصاره هیدروالکلی گزنه سبب کاهش نکرور نورون‌های ناحیه CA3 هیپوکامپ در موش‌های دیابتی شد: نتایج آزمون کروسکال والیس نشان داد که بین گروه‌های مطالعه‌شده در تعداد سلول‌های نکروتیک در ناحیه CA3 هیپوکامپ تفاوت معنادار وجود داشت ($P = 0.001$). مقایسه گروه‌ها با استفاده از آزمون تعقیبی اصلاح‌شده بونفرونی نشان داد که گروه دیابت-کنترل به‌طور درخور توجهی در مقایسه با گروه سالم-کنترل از سلول‌های نکروتیک بیشتری برخوردار بود ($P = 0.016$) و شش هفته اجرای تمرین استقامتی و مصرف عصاره گزنه سبب کاهش سلول‌های نکروتیک در ناحیه CA3 هیپوکامپ گروه دیابت-تمرین-گزنه در مقایسه با گروه کنترل-دیابت شد ($p=0.029$)، اما کاهش تعداد سلول‌های نکروتیک در گروه‌های دیابت-تمرین ($P = 1.000$) و دیابت-گزنه ($P = 1.000$) در مقایسه با گروه دیابت-کنترل معنادار نبود. همچنین تفاوت معنادار بین گروه دیابت-تمرین با گروه دیابت-گزنه ($P = 1.000$)، گروه دیابت-تمرین با گروه دیابت-تمرین-گزنه ($p=1.000$) و گروه دیابت-گزنه با گروه دیابت-تمرین-گزنه ($P = 1.000$) مشاهده نشد. به‌علاوه، بین گروه‌های سالم-کنترل، سالم-تمرین، سالم-گزنه و سالم-تمرین-گزنه در تعداد سلول‌های نکروتیک تفاوتی مشاهده نشد. همچنین مقایسه گروه‌های سالم و دیابتی نشان داد که تفاوت معنادار بین

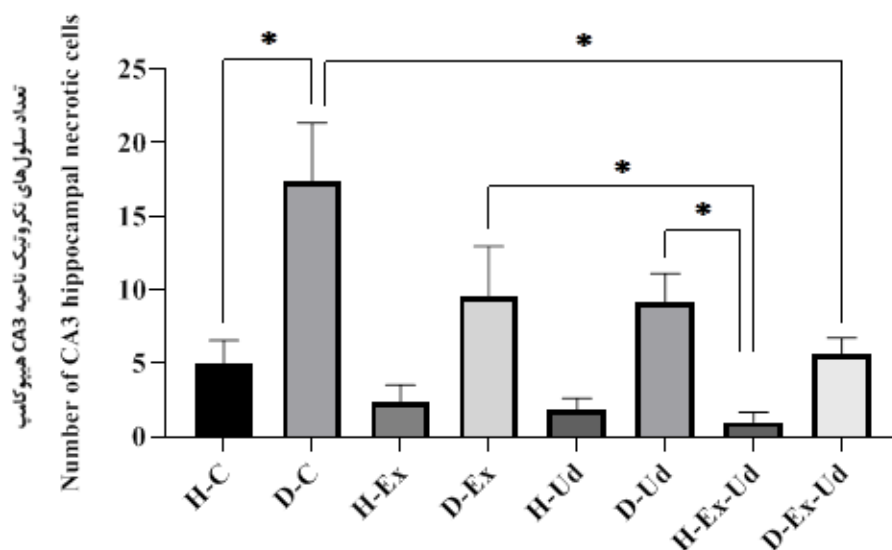
گروه‌های دیابت-گزنه ($P = 0.015$) و دیابت-تمرین ($P = 0.017$) با گروه سالم-تمرین-گزنه وجود داشت و بین گروه‌های دیابت-تمرین-گزنه با سالم-تمرین-گزنه تفاوت معنادار مشاهده نشد ($P = 0.678$) (شکل شماره چهار).

نتایج رنگ‌آمیزی کریزیل ویوله نشان داد که در ناحیه CA3 هیپوکامپ موش‌های دیابتی در مقایسه با گروه‌های سالم، سلول‌ها به‌صورت نامنظم و تیره بودند که هسته و هستک آن‌ها مشخص نبود که به‌دنبال اجرای تمرین استقامتی و مصرف عصاره گزنه، این اختلالات در مقایسه با گروه دیابت-کنترل کاهش داشت (شکل شماره سه).



شکل ۳- تصاویر بافتی رنگ‌آمیزی کریزیل ویوله در ناحیه CA3 هیپوکامپ گروه‌های دیابتی و سالم پژوهش (سلول‌های نکروتیک با علامت ▲ روی تصاویر بافتی در گروه‌های مختلف مشخص شده است. بزرگ‌نمایی تصاویر سمت راست X ۴۰ و سمت چپ X ۱۰ است).

Figure 3 - Tissue images of chrysalis violet staining in the CA3 region of the hippocampus of diabetic and healthy groups. Necrotic cells are marked with ▲ on tissue images in different groups. The image magnification is 40x on the right and 10x on the left.



شکل ۴- تعداد سلول‌های نکروتیک ناحیه CA3 هیپوکامپ

*: تفاوت معنادار در سطح $P < 0.05$

Figure 4- The number of necrotic cells in the CA3 region of the hippocampus. * Shows a significant difference in level ($p < 0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، تزریق STZ موجب افزایش معناداری در سطح قندخون موش‌های دیابتی شد؛ به طوری که در گروه‌های دیابت-تمرین-گزنه از هفته دوم، دیابت-گزنه از هفته سوم و دیابت-تمرین از هفته چهارم اجرای پروتکل پژوهش، کاهش معنادار قندخون در موش‌های این گروه‌ها در مقایسه با مرحله بعد از تزریق STZ مشاهده شد و این کاهش تا هفته ششم پروتکل پژوهش ادامه داشت. نکته درخور توجه در یافته‌های این پژوهش درباره اثرگذاری تمرین ورزشی و عصاره گزنه بر کاهش سطح قندخون این بود که عصاره گزنه روند افزایش سریعی بر کاهش قندخون در هفته‌های اول تا سوم داشت و از هفته سوم به بعد به صورت آرام پیش رفت، اما تمرین استقامتی در هفته‌های اول و دوم روندی آرام و از هفته سوم به بعد سبب کاهش بیشتر سطح قندخون در مقایسه با عصاره گزنه شد؛ به طوری که در انتهای پروتکل، سطح قندخون در گروه ورزشی کمتر از گروه دریافت‌کننده گزنه شد.

همچنین نتایج بافتی پژوهش حاضر نشان داد که دیابت سبب افزایش سلول‌های نکروتیک در ناحیه CA3 هیپوکامپ شد و شش هفته اجرای تمرین استقامتی به‌همراه مصرف گزنه در گروه دیابت-تمرین-گزنه در مقایسه با گروه‌های دیابت-تمرین و دیابت-گزنه، تأثیر بسزایی بر کاهش سلول‌های نکروز شده در مقایسه با گروه دیابت-کنترل داشت. گزارش شده است که ورزش منظم باعث بهبود کنترل متابولیک در حیوانات و انسان‌های دیابتی می‌شود و یک جزء مهم در درمان دیابت محسوب می‌شود (۳۶). عضلات اسکلتی به‌واسطه مجموعه‌ای سازگاری‌های ساختاری و عملکردی به ورزش مزمن، از طریق مکانیسم‌های مختلفی از جمله افزایش جریان خون عضلانی، افزایش اتصال انسولین به گیرنده^۱ آن و افزایش تعداد IR ممکن است به‌صورت موضعی سبب بهبود جذب و دفع گلوکز بعد از ورزش شوند (۳۶).

همچنین این مطالعه نشان داد که عصاره هیدروالکلی گزنه اثر هیپوگلیسمیک چشمگیری بر موش‌های صحرایی دیابتی تحت درمان داشت. ترکیبات طبیعی زیادی وجود دارد که اثرات ضددیابتی آن‌ها ثابت شده است که از جمله این ترکیبات گلیکوپپتیدها، ترپنوئیدها پپتیدها، آمین‌ها، فلاونوئیدها، لپیدها و کومارین‌هاست. مکانیسم‌هایی که به این ترکیبات پیشنهاد شده است، عبارت‌اند از: تحریک گلیکوژن، گلیکولیز کبدی، بلوک کانال‌های پتاسیم سلول‌های بتای پانکراس و تنظیم جذب گلوکز از دیواره روده (۳۷). از میان ترکیبات ذکر شده که خاصیت ضددیابتی دارند، وجود فلاونوئیدها، پپتید و آمین‌ها و کومارین‌ها و یون‌های معدنی در برگ گزنه ثابت شده است. گزنه حاوی مقادیر زیادی فلاونوئید است که در بهبود شاخص‌های قندخون مؤثر هستند (۳۸، ۳۹). همچنین گزنه بر سطح جذبی روده و آنزیم‌های تجزیه‌کننده کربوهیدرات اثر می‌گذارد و سبب مهار آلفا گلوکوزیداز می‌شود (۴۰). عصاره هیدروالکلی گزنه از راه خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود و پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد، سبب بازسازی بتای پانکراس می‌شود و از این راه سبب کاهش میزان قندخون موش‌های دیابتی می‌شود (۴۱). درباره اثرگذاری هم‌زمان مصرف گزنه و تمرین ورزشی، مطالعه حاضر نشان‌دهنده اثر بهتر ترکیب دو روش مداخله‌ای بر کاهش قندخون است. بهبود گلیسمیک در گروه دیابت-ورزش-گزنه می‌تواند به دلیل آثار پانکراتیک و غیرپانکراتیک گزنه بر سطح قندخون به‌همراه نقش ورزش در کاهش قندخون به‌واسطه کاهش مقاومت به انسولین و بهبود تعادل انرژی در اثر ورزش در بیماران مبتلا به دیابت باشد.

از دیگر نتایج این مطالعه بررسی سلول‌های نکروتیک در منطقه CA3 هیپوکامپ بود. نتایج بافتی نشان داد دیابت سبب افزایش سلول‌های نکروتیک در این منطقه شده است و اجرای تمرین استقامتی و مصرف گزنه روند کاهشی در این سلول‌ها در مقایسه با گروه کنترل-دیابت داشته است. استرس

1. Insulin Receptor (IR)

اکسیداتیو در بیماران دیابتی و در مدل‌های حیوانی دیابت افزایش می‌یابد. به‌طور خاص، رادیو ایمونوهیستوشیمی نشان داده است که در همه مناطق هیپوکامپ در موش‌های دیابتی که تحت تأثیر استرس قرار دارند، پروتئین HNE^۱ افزایش می‌یابد. HNE محصول آلدئید پراکسیداسیون لیپید است که مانع انتقال گلوکز و جذب گلوتامات و همچنین تولید آپوپتوز عصب‌های هیپوکامپ می‌شود. این تغییرات مولکولی، سلولی و مورفولوژیک ناشی از استرس و دیابت ممکن است به نقایص شناختی مشاهده‌شده در بیماران دیابتی سالمند و موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت مبتلا به STZ کمک کند. به‌طور خلاصه، دیابت محیط‌زیستی را ایجاد می‌کند که آسیب‌پذیری عصبی‌زا با عوامل استرس‌زا افزایش می‌دهد (۴۲). در این مطالعه به احتمال زیاد عصاره گزنه توانسته است سطح استرس سلولی را کاهش دهد و به‌دنبال این کاهش موجب بهبود و جلوگیری از مرگ سلول‌های هرمی هیپوکامپ شود؛ به‌طوری‌که در میان فلاونوئیدهای موجود در گزنه، کوئرستین از سایر ترکیبات فلاونوئیدی بیشتر است و با خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود عملکرد سلولی را تغییر می‌دهد (۳۹) و گزارش شده است که عصاره گزنه موجب مهار شدید و وابسته به دوز ترشح فاکتور نکروز تومور و اینترلوکین-۶ می‌شود (۴۳). به‌علاوه، از طریق ماده مؤثر کافئیک مالیک که عمده‌ترین جزء فنولی گیاه گزنه محسوب می‌شود، سنتز سیکلواکسیژنازها را به‌صورت وابسته به دوز مهار می‌کند و از این راه موجب مهار تولید سیتوکین-ها می‌شود (۴۴). همچنین گزنه می‌تواند از راه مهار مسیر فاکتور نکروزی تولید سیتوکین‌ها را مهار کند (۴۵)؛ بنابراین عصاره هیدروالکلی گزنه نه‌تنها می‌تواند اثر درمانی در راستای کاهش قندخون داشته باشد، بلکه برای پیشگیری از عوارض دیابت بر سیستم عصبی نیز می‌تواند مفید باشد. علاوه بر یافته‌های به‌دست‌آمده در زمینه اثرگذاری گیاه گزنه بر دیابت، مطالعات نشان داده‌اند که تمرین‌های ورزشی نیز با ایجاد وضعیت محافظت درون‌زا در سلول‌های عصبی و از طریق افزایش حساسیت به انسولین و کاهش عوامل خطرزا موجب زنده‌ماندن سلول‌های عصبی و حفاظت از آن‌ها در برابر نوروپاتی دیابتی می‌شوند (۴۶، ۴۷). یکی از مکانیسم‌های احتمالی تمرین ورزشی در زمینه محافظت نوروپاتی می‌تواند کاهش تشکیل رادیکال‌های آزاد باشد. زمانی که سطح رادیکال‌های آزاد بیش از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول باشد، می‌توانند به مرگ سلول منجر شوند. استرس اکسیداتیو ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن به‌شدت با دیابت و عوارض آن در ارتباط است و می‌تواند مرگ سلولی را از طریق مسیرهای مختلف راه‌اندازی کند. از سوی دیگر، مغز دارای ویژگی آنتی‌اکسیدانی بسیار کمی است و بیشترین میزان اسیدهای چرب اشباع و کاتکولامین‌ها را دارد که به‌راحتی اکسید می‌شوند و مغز را در معرض آسیب‌های اکسایشی بیشتری قرار می‌دهند (۴۸). تمرین ورزشی منظم از طریق افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی به کاهش استرس اکسیداتیو و کاهش عوارض دیابت از جمله

کاهش مرگ نوروها منجر می‌شود (۴۷)؛ به طوری که نشان داده شده است که در نتیجه فعالیت بدنی سطح آنزیم آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز در نقاط مختلف مغز افزایش می‌یابد و موجب افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مغز می‌شود (۴۹). همچنین تمرین‌های ورزشی علاوه بر افزایش حساسیت به انسولین محیطی، ممکن است سبب افزایش انتقال/فعال‌سازی (pTyT-IR) و افزایش پاسخ پروتئین‌های پایین دست به سیگنالینگ انسولین برای مثال pAKTser473 در هیپوکامپ شود. حضور IR در هیپوکامپ و قشر مغزی تأثیر بسزایی بر روند یادگیری و حافظه دارد. در واقع نشان داده شده است که انسولین، حافظه را در انسان و حیوانات آزمایشگاهی افزایش می‌دهد. به طور مشابه، تمرین‌های ورزشی بر شکل‌پذیری هیپوکامپ و عملکرد حافظه تأثیر مثبت دارند (۵۰).

از دیگر مکانیسم‌های احتمالی ورزش در زمینه قابلیت محافظت نرونی در برابر مرگ نرونی می‌توان به کاهش مقاومت به انسولین، کاهش استرس اکسایشی و بهبود شکل‌پذیری سیناپسی به دنبال افزایش بیان و فسفوریلاسیون پروتئین کیناز B، پروتئین ضد آپوپتوزی Bcl-2 و مهار پروتئین پیش‌آپوپتوزی Bax و کاهش فعالیت کاسپازی اشاره کرد (۵۱). اثرات مفید تمرین‌های ورزشی بر کاهش عوارض دیابت می‌تواند در بخشی به دلیل تنظیم افزایشی پروتئین‌های محافظتی حساس به استرس از قبیل فاکتور هسته‌ای کاپا B، افزایش پروتئین شوک گرمایی (۵۲)، افزایش سطوح سایتوکین‌های ضدالتهابی در مقایسه با سایتوکین‌های پیش‌التهابی (۵۳) و تنظیم افزایشی بیان نوروتروفین‌ها (۴۶) باشد. با توجه به نتایج پژوهش حاضر و پژوهش‌های مبنی بر اثرات مفید مصرف عصاره گزنه و اجرای تمرین ورزشی بر جنبه‌های مولکولی و بافتی در بیماران دیابتی، به احتمال زیاد، تمرین ورزشی همراه با عصاره گزنه سبب بهبود و تنظیم افزایشی بیشتر جنبه‌های مثبت و کاهش بیشتر جنبه‌های منفی در مقایسه با اثرات تکی این مداخلات بر مسیرهای مرگ سلولی می‌شود؛ البته برای تأیید این امر به انجام دادن پژوهش‌های بیشتری در این زمینه نیاز است. پیشنهاد می‌شود علاوه بر اندازه‌گیری‌های مولکولی مرتبط، برای دستیابی به بهترین اثرگذاری تمرین استقامتی و عصاره هیدروالکلی گزنه بر بافت عصبی مرکزی به ویژه بافت هیپوکامپ در بیماران دیابتی، پروتکل‌های تمرینی مختلف در کنار دوزهای مصرفی متفاوت گزنه بررسی شود.

پیام مقاله

به طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که تمرین استقامتی به همراه مصرف عصاره هیدروالکلی گزنه می‌تواند به طور درخور توجهی مرگ سلولی ناشی از دیابت را در نوروهای ناحیه CA3 هیپوکامپ را به دنبال کاهش سطح قندخون تعدیل کند. همچنین استفاده از مداخلات ورزشی و گیاهی گزنه

می‌تواند اثرات محافظتی در برابر نوروپاتی دیابتی ایجاد کند و دیدگاه درمانی نوینی را در برابر مرگ سلول‌های عصبی هیپوکامپ ناشی از دیابت پیشنهاد دهد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه برگرفته از رساله دکتری رشته فیزیولوژی ورزشی دانشگاه لرستان است که با کد ۹۷۰۱۶۶۰۸ از سوی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور حمایت مالی شده است و به انجام شدن این پژوهش و تهیه مقاله منجر شد. بدین وسیله از حمایت این صندوق به منظور انجام دادن این پژوهش تشکر و قدردانی می‌کنیم.

منابع

1. Saravia FE, Beauquis J, Revsin Y, Homo-Delarche F, de Kloet ER, De Nicola AF. Hippocampal neuropathology of diabetes mellitus is relieved by estrogen treatment. *Cellular and molecular neurobiology*. 2006;26(4-6):941-55.
2. den Heijer T, Vermeer S, Van Dijk E, Prins N, Koudstaal PJ, Hofman A, et al. Type 2 diabetes and atrophy of medial temporal lobe structures on brain MRI. *Diabetologia*. 2003;46(12):1604-10.
3. Beauquis J, Saravia F, Coulaud J, Roig P, Dardenne M, Homo-Delarche F, et al. Prominently decreased hippocampal neurogenesis in a spontaneous model of type 1 diabetes, the nonobese diabetic mouse. *Experimental neurology*. 2008;210(2):359-67.
4. Magariños AM, McEwen BS. Experimental diabetes in rats causes hippocampal dendritic and synaptic reorganization and increased glucocorticoid reactivity to stress. *PNAS*. 2000;97(20):11056-61.
5. Valastro B, Cossette J, Lavoie N, Gagnon S, Trudeau F, Massicotte G. Up-regulation of glutamate receptors is associated with LTP defects in the early stages of diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2002;45(5):642-50.
6. Zhao W-Q, Chen H, Quon MJ, Alkon DL. Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory. *European journal of pharmacology*. 2004;490(1-3):71-81.
7. Sima AA, Li Z-g, Zhang W. The insulin-like growth factor system and neurological complications in diabetes. *Journal of Diabetes Research*. 2003;4(4):235-56.
8. Robinson R, Krishnakumar A, Paulose C. Enhanced dopamine D1 and D2 receptor gene expression in the hippocampus of hypoglycaemic and diabetic rats. *Cellular and molecular neurobiology*. 2009;29(3):365-72.
9. Aragno M, Mastrocola R, Medana C, Restivo F, Catalano MG, Pons N, et al. Up-regulation of advanced glycated products receptors in the brain of diabetic rats is prevented by antioxidant treatment. *Endocrinology*. 2005;146(12):5561-7.
10. Orlovsky M, Spiga F, Lebed Y, Skibo G, Lightman S. Early molecular events in the hippocampus of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Neurophysiology*. 2007;39(6):435-8.

11. Lebed YV, Orlovsky M, Lushnikova I, Skibo G. Neurodegenerative changes in the hippocampus within the early period of experimental diabetes mellitus. *Neurophysiology*. 2008;40(1):26-33.
12. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine reviews*. 2002;23(5):599-622.
13. Guzman SJ, Schlögl A, Frotscher M, Jonas P. Synaptic mechanisms of pattern completion in the hippocampal CA3 network. *Science*. 2016;353(6304):1117-23.
14. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and β -cell dysfunction? *Diabetes*. 2003;52(1):1-8.
15. Oguntibeju OO. Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links. *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology*. 2019;11(3):45-63.
16. Shamsaei N, Abdi H, Shamsi M. The Effect of a continuous training on necrosis and apoptosis changes in the hippocampus of diabetic rats. *SJIMU*. 2017;25(1):1-11.
17. Cotman CW, Berchtold NC, Christie L-A. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *TINS*. 2007;30(9):464-72.
18. de Senna PN, Ilha J, do Nascimento PS, Leite MC, Paim MF, Gonçalves CA, et al. Effects of physical exercise on spatial memory and astroglial alterations in the hippocampus of diabetic rats. *Metabolic brain disease*. 2011;26(4):269-279.
19. Voulgari C, Papadogiannis D, Tentolouris N. Diabetic cardiomyopathy: from the pathophysiology of the cardiac myocytes to current diagnosis and management strategies. *Vascular health and risk management*. 2010;6:883-903.
20. Teixeira-Lemos E, Nunes S, Teixeira F, Reis F. Regular physical exercise training assists in preventing type 2 diabetes development: focus on its antioxidant and anti-inflammatory properties. *Cardiovascular diabetology*. 2011;10(1):1-15.
21. Gharakhanlou R, Chadan S, Gardiner P. Increased activity in the form of endurance training increases calcitonin gene-related peptide content in lumbar motoneuron cell bodies and in sciatic nerve in the rat. *Neuroscience*. 1999;89(4):1229-39.
22. Mazzola PN, Terra M, Rosa AP, Mescka CP, Moraes TB, Piccoli B, et al. Regular exercise prevents oxidative stress in the brain of hyperphenylalaninemic rats. *Metabolic brain disease*. 2011;26(4):291-297.
23. Kavalalı G, Tuncel H, Göksel S, Hatemi H. Hypoglycemic activity of *Urtica pilulifera* in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003;84(2):241-5.
24. Yener Z, Celik I, Ilhan F, Bal R. Effects of *Urtica dioica* L. seed on lipid peroxidation, antioxidants and liver pathology in aflatoxin-induced tissue injury in rats. *FCT*. 2009;47(2):418-24.
25. Patel SS, Udayabanu M. Effect of *Urtica dioica* on memory dysfunction and hypoalgesia in an experimental model of diabetic neuropathy. *Neuroscience Letters*. 2013;552:114-9.
26. Oishi N, Nomoto M, Ohkawa N, Saitoh Y, Sano Y, Tsujimura S, et al. Artificial association of memory events by optogenetic stimulation of hippocampal CA3 cell ensembles. *Molecular brain*. 2019;12(1):1-10.

27. Cherubini E, Miles RM. The CA3 region of the hippocampus: how is it? What is it for? How does it do it? *Frontiers in cellular neuroscience*. 2015;9(19):1-3.
28. Rahmati M, Kazemi A. Various exercise intensities differentially regulate GAP-43 and CAP-1 expression in the rat hippocampus. *Gene*. 2019;692:185-94.
29. Rahmati M, Gharakhanlou R, Movahedin M, Mowla SJ, Khazani A, Fouladvand M, et al. Treadmill Training Modifies KIF5B Moter Protein in the STZ-induced Diabetic Rat Spinal Cord and Sciatic Nerve. *AIM*. 2015;18(2):94-101.
30. Ahmadi M, Hajhashemi S, Chehrei A, Hosseini N. Therapeutic effects of *Urtica dioica* methanolic extract on gentamicin induced nephrotoxicity in rats. *Koomesh*. 2014;15(2):220-31.
31. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*. 299: Elsevier; 1999. p. 152-78.
32. Patel SS, Gupta S, Udayabanu M. *Urtica dioica* modulates hippocampal insulin signaling and recognition memory deficit in streptozotocin induced diabetic mice. *Metabolic brain disease*. 2016;31(3):601-11.
33. Sharifi AM, Baniasadi S, Jorjani M, Rahimi F, Bakhsayesh M. Investigation of acute lead poisoning on apoptosis in rat hippocampus in vivo. *Neuroscience letters*. 2002;329(1):45-8.
34. Matsuwaki T, Asakura R, Suzuki M, Yamanouchi K, Nishihara M. Age-dependent changes in progranulin expression in the mouse brain. *Journal of Reproduction and Development*. 2011;57(1):113-9
35. Azad N, Rasoolijazi H, Joghataie MT, Soleimani S. Neuroprotective effects of carnosic acid in an experimental model of Alzheimer's disease in rats. *Cell Journal* 2011;13(1):39-44.
36. Gomes R, de Mello M, Caetano F, Sibuya C, Anaruma CA, Rogatto G, et al. Effects of swimming training on bone mass and the GH/IGF-1 axis in diabetic rats. *Growth Hormone & IGF Research*. 2006;16(5-6):326-31.
37. Kamaei L, Moghadamnia D. Comparison of Antidiabetic Effects of Aqueous Extract of the Leaves and Fruits of *Avicennia Marina* in Streptozotocin-induced Diabetic Male Rats. *Iranian Journal of Toxicology*. 2019;13(2):7-12.
38. Mehri A, Hasani-Ranjbar S, Larijani B, Abdollahi M. A systematic review of efficacy and safety of *Urtica dioica* in the treatment of diabetes. *IJP*. 2011;7(2):161-70.
39. Song Y, Manson JE, Buring JE, Sesso HD, Liu S. Associations of dietary flavonoids with risk of type 2 diabetes, and markers of insulin resistance and systemic inflammation in women: a prospective study and cross-sectional analysis. *JACN*. 2005;24(5):376-84.
40. Önal S, Timur S, Okutucu B, Zihnioğlu F. Inhibition of α -glucosidase by aqueous extracts of some potent antidiabetic medicinal herbs. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 2005;35(1):29-36.
41. Golalipour MJ, Khorri V. The protective activity of *Urtica dioica* leaves on blood glucose concentration and beta-cells in streptozotocin-diabetic rats. *PJBS* 2007;10(8):1200-4.

42. Reagan LP, Magariños AM, Yee DK, Swzeda LI, Van Bueren A, McCall AL, et al. Oxidative stress and HNE conjugation of GLUT3 are increased in the hippocampus of diabetic rats subjected to stress. *Brain research*. 2000;862(1-2):292-300.
43. Teucher T, Obertreis B, Ruttkowski T, Schmitz H. Cytokine secretion in whole blood of healthy subjects following oral administration of *Urtica dioica* L. plant extract. *Arzneimittelforschung*. 1996;46(9):906-10.
44. Obertreis B, Giller K, Teucher T, Behnke B, Schmitz H. Anti-inflammatory effect of *Urtica dioica* folia extract in comparison to caffeic malic acid. *Arzneimittelforschung*. 1996;46(1):52-6.
45. Chevassus H, Mourand I, Molinier N, Lacarelle B, Brun J-F, Petit P. Assessment of single-dose benzodiazepines on insulin secretion, insulin sensitivity and glucose effectiveness in healthy volunteers: a double-blind, placebo-controlled, randomized cross-over trial [ISRCTN08745124]. *BMC clinical pharmacology*. 2004;4(1):1-10.
46. Ang E, Wong P, Moochhala S, Ng Y. Neuroprotection associated with running: is it a result of increased endogenous neurotrophic factors? *Neuroscience*. 2003;118(2):335-45.
47. Atalay M, Laaksonen DE. Diabetes, oxidative stress and physical exercise. *JSSM*. 2002;1(1):1-14.
48. Hong J-H, Kim M-J, Park M-R, Kwag O-G, Lee I-S, Byun BH, et al. Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clinica chimica acta*. 2004;340(1-2):107-15.
49. Aksu I, Topcu A, Camsari UM, Acikgoz O. Effect of acute and chronic exercise on oxidant-antioxidant equilibrium in rat hippocampus, prefrontal cortex and striatum. *Neuroscience letters*. 2009;452(3):281-5.
50. Muller AP, Gnoatto J, Moreira JD, Zimmer ER, Haas CB, Lulhier F, et al. Exercise increases insulin signaling in the hippocampus: physiological effects and pharmacological impact of intracerebroventricular insulin administration in mice. *Hippocampus*. 2011;21(10):1082-92.
51. Aguiar Jr AS, Castro AA, Moreira EL, Glaser V, Santos AR, Tasca CI, et al. Short bouts of mild-intensity physical exercise improve spatial learning and memory in aging rats: involvement of hippocampal plasticity via AKT, CREB and BDNF signaling. *Mechanisms of ageing and development*. 2011;132(11-12):560-7.
52. Kwak H-B. Effects of aging and exercise training on apoptosis in the heart. *J Exerc Rehabil*. 2013;9(2):212-219.
53. Suzuki K, Nakaji S, Yamada M, Totsuka M, Sato K, Sugawara K. Systemic inflammatory response to exhaustive exercise. *Cytokine kinetics*. *EIR*. 2002;8:6-48.

استناد به مقاله

کشوری مریم، رحمتی مسعود، میرنصوری رحیم، چهل چراغی فرزانه. اثر شش هفته تمرین استقامتی و عصاره هیدروالکلی گزنه بر سطح قندخون و سلول‌های نکروتیک ناحیه CA3 هیپوکامپ موش‌های صحرایی نژاد ویستار در مدل دیابت نوع یک. فیزیولوژی ورزشی. پاییز ۱۴۰۰؛ ۱۳(۵۱): ۴۳-۶۸. شناسه دیجیتال: 10.22089/SPJ.2020.8033.1969

M. Keshvari, M. Rahmati, R. Mirnasouri, F. Chehelcheraghi. The effect of six weeks of endurance exercise and hydro alcoholic extract of *Urtica dioica* on blood glucose level and necrotic cells of hippocampal CA3 region of Wistar rats in type 1 diabetes model. Fall 2021; 13(51): 43-68. (In Persian). Doi: 10.22089/SPJ.2020.8033.1969