

اثر حفاظتی عصاره هیدروالکلی برگ گیاه گزنه بر تغییرات هیستولوژیک و مورفومتریک کلیه در موش های صحرایی هیپرگلیسمیک

محمدجعفر گلعلی پور^{۱*}، انه محمد غراوی^۲، ثریا غفاری^۲، رامین آذرهوش^۳

۱- استاد گروه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی گلستان ۲- کارشناس ارشد گروه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی گلستان

۳- استادیار گروه آسیب شناسی دانشگاه علوم پزشکی گلستان

سابقه و هدف: هیپرگلیسمی می تواند موجب تغییرات هیستولوژیک و مورفولوژیک کلیه گردد. این مطالعه با هدف بررسی اثر محافظتی عصاره هیدروالکلی برگ گیاه گزنه (*Urtica dioica*) بر تغییرات هیستولوژیک و مورفومتریک کلیه در موش صحرایی هیپرگلیسمیک انجام شد.

مواد و روشها: ۳۰ سر موش صحرایی نر ویستار به سه گروه شاهد، دیابتی و حفاظتی تقسیم شدند. دیابت با تزریق داخل صفاقی استرپتوزوسین (80 mg/kg) در موش های گروه دیابتی القا شد. در گروه حفاظتی دره روز اول عصاره گزنه (100 mg/kg/day) از طریق تزریق داخل صفاقی دریافت و سپس با استرپتوزوسین دیابتی شدند. پس از انجام آزمایشات کلیه حیوانات در محلول بافر فرمالین فیکس و رنگ آمیزی گردید.

یافته ها: میانگین گلوکز خون در پایان هفته پنجم در گروه کنترل، دیابتیک و حفاظتی به ترتیب $99/4$ ، $404/7$ و $302/6$ تعیین شد که در گروه حفاظتی در مقایسه با گروه دیابتی کمتر بود ($p<0/05$). نسبت وزن کلیه به وزن بدن در گروه شاهد، دیابتی و حفاظتی به ترتیب $0/42$ ، $0/51$ و $0/48$ تعیین شد ($p<0/05$). مساحت گلومرول در گروه شاهد، دیابتیک و حفاظتی به ترتیب $1326/4$ و $1441/8$ ، $1335/3$ و $1326/4$ میکرومترمکعب تعیین گردید ($p<0/05$). قطر گلومرول ها در گروه دیابتی ($162/2$ میکرومتر) نسبت به گروه های شاهد ($156/1$) و حفاظتی ($153/2$) افزایش یافت. در گروه دیابتی یافته های آسیب شناسی به نفع گلومرول اسکلروز بود. ساختار کلیه در گروه حفاظتی مانند گروه شاهد بود.

نتیجه گیری: عصاره برگ گزنه یک اثر حفاظتی در جلوگیری از افزایش میزان گلوکز خون داشته و می تواند از تغییرات مورفومتریک و هیستوپاتولوژیک کلیه در موش های هیپرگلیسمیک جلوگیری کند.

واژه های کلیدی: گزنه، دیابت، قند خون، کلیه، گلومرول، هیپرگلیسمی، استرپتوزوسین.

دریافت: ۸۷/۴/۲۳، **ارسال جهت اصلاح:** ۸۷/۶/۲۷، **پذیرش:** ۸۷/۹/۱۳

مقدمه

دیابت شیرین بیماری ناشی از اختلال متابولیک است که بتدریج عملکرد سایر سیستم های بدن را مختل می کند و اعتقاد بر این است که کنترل نامناسب قند خون عامل اصلی در ایجاد عوارض دیابت است (۱). از آنجایی که عوامل مشابهی در ایجاد عوارض کلیوی و دیگر عوارض دیابت از جمله رتینوپاتی و اختلالات عروق ریز درگیر هستند، مطالعات متعددی بر روی تغییرات کلیه پس از دیابت متمرکز شده است (۱). استفاده از درمان های جایگزین یا کمک کننده به یکی از موضوعات اصلی محققان در سرتاسر جهان

تبدیل شده است. این گرایش بدین دلیل است که بسیاری از داروهای مورد استفاده در بیماری ها از جمله دیابت علیرغم فواید غیر قابل انکار دارای اثرات مخرب بر روی بدن می باشند (۲). بر طبق مطالعه Ryan و همکاران بسیاری از بیماران دیابتی همراه با داروهای کنترل کننده قند خون از دیگر داروها نظیر گزنه استفاده می کنند (۳). تیره گزنه *Urticaceae* شامل گیاهانی است عموماً [هزینه انجام این پژوهش در قالب طرح تحقیقاتی شماره ۲۲۵۹ از اعتبارات دانشگاه علوم پزشکی گلستان تأمین شده است.

گیری روش ماسراسیون به مدت ۷۲ ساعت با هم زدن مداوم انجام گرفت (نسبت حلال با استفاده از محلول هیدرو الکلی ۶۰٪ از اتانل). مایع ژلاتینی نهایی بعد از صاف کردن با استفاده از دستگاه تقطیر در خلاء و تغلیظ کردن تهیه گردید.

ایجاد هیپرگلیسمی با استرپتوزتوسین و انجام آزمایشات پایلوت: جهت ایجاد دیابت، موش های صحرایی نر سالم (۵) با دوزهای ۵۵، ۶۰، ۸۰، ۸۵ و ۹۰ میلی گرم بر کیلوگرم، استرپتوزتوسین (بافر استات یک دهم مولار با $\text{pH} = 4$) مورد تزریق داخل صفاقی قرار گرفتند. نمونه خون قبل از تزریق و ۴۸ ساعت بعد از تزریق جمع آوری شد. موش های صحرایی هیپرگلیسمیک که بیش از دو هفته قند خون بالای ۲۵۰ میلی گرم در دسی لیتر داشتند به عنوان دیابتی تعیین گردیدند. با توجه به مشاهدات صورت گرفته دوز مناسب استرپتوزتوسین برای این آزمایش ۸۰ mg/kg داخل صفاقی انتخاب گردید.

اندازه گیری سطح گلوکز خون: برای آزمایش

اندازه گیری سطح گلوکز خون از گلوکومتر استفاده شد. در این روش قطره ای از خون با لانتست زدن دم حیوان مستقیماً بر روی نوار کاغذی گلوکومتر منتقل و بعد از چند ثانیه دستگاه غلظت گلوکز خون را برحسب میلی گرم در دسی لیتر نشان می داد. برای ارزیابی دقت اندازه گیری با این روش میزان گلوکز خون یک موش صحرایی نرمال ۵ مرتبه متوالی اندازه گیری شد.

تست تحمل گلوکز: همچنین تست تحمل گلوکز داخل صفاقی جهت تعیین روند ترشح انسولین انجام شد. دکستروز در دوز ۲ گرم در هر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی تزریق و نمونه های خونی، در زمان صفر، ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه جمع آوری و اندازه گیری گردید. تست تحمل گلوکز بعد از تزریق گزنه و استرپتوزتوسین و در هفته های ۱، ۳ و ۵ انجام گردید.

آزمایشات هیستوپاتولوژی: پس از انجام آزمایشات موش های صحرایی با کلروفرم بیهوش شده و تشریح گردید. پس از تشریح کلیه های آنها در آورده شده در محلول بافر فرمالین فیکس گردید. نمونه ها سپس تحت فرایند بافتی قرار گرفته و از هر گروه تعداد ۳ الی ۵ نمونه قالب گیری گردید. سپس کلیه ها از یک سمت (نقطه شروع) تا پایان با دقت به قطعات یک میلیمتری تقسیم گردید. به طور میانگین حدود ۱۱-۱۰ قطعه یک میلیمتری از کلیه ها بدست آمد. پس از پروسه بافتی تعداد ۱ تا ۳ عدد مقطع بافتی از این قطعات

علفی چند ساله به ارتفاع ۸۰-۱۰ سانتی متر و بیشتر اعضای هوایی آن پوشیده از کرک قلاب مانند و با مخروطی شکل می باشد (۴). از واریته های مختلف گزنه *Urtica dioica* بعنوان گیاه دارویی از زمان های بسیار دور مورد توجه قرار داشته است (۵).

گزنه به عنوان ضد التهاب، کاهنده قند خون، دیورتیک، ضد درد، بی حس کننده موضعی، رفع التهاب پروستات، قاعده آور و رفع اختلاط خونی بکار می رود. همچنین گیاه گزنه در طب سنتی ایران بعنوان داروی کمکی در درمان دیابت معرفی شده است (۵). ترکیبات گزنه شامل هیستامین، اسید فرمیک، استیل کولین، اسید استیک، اسید بوتیریک، لکوترین، ۵ هیدروکسی تریپتامین، فلاونوئید ترکیبات هیدروفیلیک نظیر لکترین و پلی ساکاریدها، ترکیبات استروئیدی نظیر استیگومسترول است (۶و۷). گزنه بدلیل داشتن فلاونوئید دارای فعالیت آنتی اکسیدانی می باشد. از آنجا که استرس اکسیداتیو یکی از مکانیزم های پاتوفیزیولوژیکی پیشرفت تغییرات هیستولوژیکی کلیه است (۸) تصور می گردد گزنه در کنترل تغییرات ساختاری کلیه تاثیر داشته باشد.

مطالعات نشان داده است که استفاده از انسولین تراپی سبب کاهش اندازه کلیه و گلومرولهای کلیه های هایپرگلاسمیک می گردد اما به اندازه اولیه قبل از بیماری نمی رسد (۹). مطالعات دیگر نشان داده است که در مراحل اولیه هیپرگلیسمی بدنبال تزریق استرپتوزتوسین (STZ)، اندازه کلیه ها و گلومرول شدیداً افزایش می یابد (۱۰). از طرفی مطالعات قبلی نشان داده است که عصاره برگ گیاه گزنه بصورت حفاظتی سبب کاهش گلوکز سرم و افزایش سلول های بتا جزایر لانگرهانس پانکراس می گردد (۱۱). لذا این مطالعه به منظور تعیین اثر حفاظتی گیاه گزنه بر روی ساختار هیستولوژیک و تغییرات مورفومتریک کلیه موشهای هایپرگلاسمیک انجام شد.

مواد و روشها

آماده سازی عصاره: برگ ها از سرشاخه های هوایی گیاه جمع آوری گردیده و اسانس گیاهی در واحد مزروعی کشت، داشت و برداشت استان گلستان تهیه گردید. کد هرباریومی (۱-۷۷-۵) توسط دانشکده داروسازی مازندران تعیین گردید. برای عصاره گیری گیاه برگ های جمع آوری شده در سایه خشک شده سپس در جریان هوای ۳۵ تا ۴۰ درجه سانتی گراد پودر ریز تهیه گردید. برای عصاره

دانشکده پزشکی دانشگاه گلستان تهیه شده بود انجام گرفت. کلیه اصول اخلاقی مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید. موش های صحرایی قبل از نمونه گیری حداقل ۱۲ ساعت گرسنه بودند. نمونه گیری ها تماماً در یک زمان مشخص (۸-۱۰) صبح انجام می گرفت. تمامی حیوانات از تغذیه یکسان و شرایط یکسان نور و تاریکی برخوردار بودند. موشهای صحرایی بصورت تصادفی به سه گروه ده تایی تقسیم شدند:

- گروه موش های شاهد سالم: نمونه های این گروه در اولین روز آزمایش، وزن شده و تست تحمل گلوکز GTT بر روی آنها انجام گرفت. نمونه ها تا ۳۶ روز هیچگونه دارویی (STZ و گزنه) دریافت نکردند.

- گروه موش های دیابتی شده با استرپتوزتوسین: این گروه نیز در روز صفر وزن و GTT شده و با تزریق STZ با غلظت ۸۰ mg/kg دیابتی شدند. یک هفته پس از تزریق STZ، تست تحمل گلوکز، جهت اطمینان از دیابتی شدن آنها انجام گرفت.

- گروه موش های حفاظتی: موش های صحرایی بودند که پس از توزین و GTT اولیه به مدت پنج روز، گزنه با غلظت ۱۰۰mg/kg دریافت کرده (۴) و پس از وزن کردن و انجام GTT با استفاده از STZ غلظت ۸۰ میلی گرم بر کیلو گرم دیابتی گردیدند. غلظت مؤثر از عصاره گزنه بصورت تازه در هر روز از رقیق کردن عصاره تغلیظ شده با آب مقطر تهیه می شد. جهت از بین بردن تفاوت در گروه شاهد، حجم معینی از نرمال سالین در گروه شاهد تزریق شد. گلوکز خون تمام موش ها در ابتدای مطالعه و در پایان هفته اول، سوم و پنجم اندازه گیری، ثبت و آنالیز گردید. داده های مربوط به بررسی های هیستولوژیکی و داده های مربوط به وزن موش های صحرایی، وزن کلیه، حجم کلیه، کورتکس، مدولا و نیز مساحت و قطر گلومرولها، قطر لوله های دور و نزدیک در گروههای مختلف جمع آوری گردیده و برای حصول نتایج به کامپیوتر انتقال داده شد. آنالیز آماری با استفاده از آزمون های ANOVA، واریانس و آزمون توکی انجام گرفت. ضریب اطمینان مطالعه ۹۵٪ تعیین شد.

یافته ها

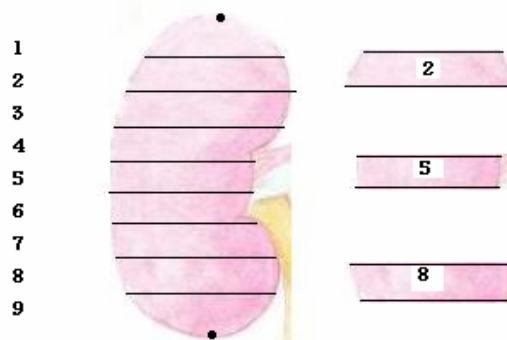
میزان گلوکز سرم خون در گروه شاهد در حد طبیعی بود (جدول شماره ۱). اثرات استرپتوزتوسین در گروه موشهای صحرایی دیابتیک بیانگر اثرات تدریجی در افزایش گلوکز خون می باشد که از

یک میلیمتری تهیه گردید. اولین مقطع برای تعیین حجم انتخاب گردید. از آنجا که از هر گروه ۱۰ کلیه انتخاب گردید و با تقسیم هر یک از آنها به ۱۰ الی ۱۲ قطعه یک میلیمتری، بطور متوسط ۱۰۰ قطعه یک میلیمتری بدست آمد. در مجموع با احتساب ۱ الی ۳ مقطع بافتی ۵ میکرونی از هر قطعه، تعداد ۲۰۰ تا ۳۰۰ مقطع بافتی مورد بررسی قرار گرفت. تمامی مقاطع بافتی با روش همتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی گردید و از ابتدا تا انتهای کلیه به دقت شماره گذاری شد. سپس تصاویر تهیه شده با بزرگ نمایی نهایی ۴۰ در میکروسکوپ پروجکشن Olympus وارد نرم افزار Olysia متصل به کامپیوتر گردید و مساحت کورتکس و مدولا برای هر برش اندازه گیری شد. بدین ترتیب مجموع مساحت برای هر برش و سپس مجموع مساحت کل کورتکس و مدولا برای هر کلیه تعیین گردید. با مشخص شدن مساحت، فاصله بین مقاطع و همچنین برش های اول و آخر هر کلیه با قوانین و فرمول های استرئولوژیکی حجم کل، حجم کورتکس و حجم مدولا تعیین گردید. فرمول مورد استفاده

$$V = \frac{\sum_{i=1}^m P.a/p.t}{M^2} \quad (۱۳ و ۱۲).$$

حجم = V مساحت = P.a فاصله بین مقاطع = p.t بزرگ نمایی = M²

نقطه شروع



نقطه پایان

سپس از قطعات شماره ۲-۵-۸ که به طور میانگین در محدوده یک سوم اولیه، میانی و انتهایی کلیه قرار داشتند، برای بررسی لوله های درهم پیچیده دور نزدیک و گلومرول ها استفاده گردید تا تقریباً از تمامی نواحی کلیه مقاطع تهیه گردند. از این قطعات تعداد ۱ تا ۳ برش ۵ میکرونی جدا گردید. هر برش بدست آمده در ۳ ناحیه مورد بررسی قرار گرفت.

طراحی آزمایش: مطالعه بصورت تجربی بر روی ۳۰ موشهای صحرایی ویستار به وزن 170 ± 50 گرم از جنس نر که از حیوان خانه

میانگین $214/1 \pm 23/8$ یک هفته پس از تزریق استرپتوزتوسین شروع و در هفته پنجم به $454/7 \pm 34/5$ میلیگرم در کیلوگرم رسیده است. روند فوق در گروه پیش درمانی در میانگین قند خون در هفته پنجم به $303/6 \pm 100/6$ رسیده که در مقایسه با گروه دیابتی کاهش معناداری را نشان داد ($p < 0/05$). در گروه کنترل، ساختار گلومولهای کلیوی، توپول ها و نیز بافت بینابینی و عروق پارانشیمی طبیعی بود. در گروه دیابتی افزایش خفیف تا متوسط در ماتریکس مزانژیوم در اغلب (75%) گلومول ها دیده شد. تغییرات به شکل منتشر در هر کدام از گلومول ها دیده و تغییرات فوکال دیده نشد. یافته ها به نفع گلومول اسکروز می باشد. ساختار کلیه در گروه حفاظتی مانند گروه کنترل بوده و ساختار کلیه هیستولوژیکی طبیعی بود.

اطلاعات مربوط به وزن موش های صحرایی، وزن کلیه، حجم کلیه، کورتکس، مدولا و نیز مساحت و قطر گلومول ها، قطر لوله های دور و نزدیک در گروه های مختلف در جداول ۲ الی ۴ نمایش داده شده است. نسبت وزن کلیه به وزن بدن در گروه شاهد، دیابتی و حفاظتی به ترتیب $0/42$ ، $0/51$ و $0/48$ تعیین شد. نسبت وزن کلیه در سه گروه با استفاده از آزمون آنالیز واریانس معنی دار بوده است ($p < 0/05$). در گروه حفاظتی اگر چه این نسبت در مقایسه

با گروه دیابتی کاهش داشت اما به نسبت گروه شاهد نرسید (جدول شماره ۲). حجم کورتکس در گروه شاهد و دیابتی و حفاظتی به ترتیب $166/1$ ، $139/6$ و $156/1$ تعیین گردید که اختلاف آماری موجود بین گروه به علت تفاوت گروه شاهد با گروه دیابتی بوده است ($p < 0/05$). همچنین حجم مدولا در ۳ گروه از نظر آماری تفاوت معنی دار داشت که این اختلاف ناشی از تفاوت بین گروه دیابتی با شاهد ($p < 0/01$) و حفاظتی با شاهد ($p < 0/04$) بوده است (جدول شماره ۳). در ارتباط با نسبت حجم کورتکس به مدولا اختلاف آماری بین گروه کنترل با گروه دیابتی و حفاظتی وجود داشت ($p < 0/05$). مساحت گلومول در گروه شاهد، دیابتیک و حفاظتی به ترتیب $1335/3$ ، $1441/8$ و $1326/5$ تعیین گردید که اختلاف آماری معنی داری بین گروه دیابتی با گروه شاهد و حفاظتی وجود داشت ($p < 0/05$). قطر گلومول در گروه شاهد و دیابتی و حفاظتی $156/2$ ، $162/2$ و $153/2$ تعیین گردید. اختلاف قطر گلومول در دیابتی در مقایسه با گروه شاهد معنی دار ($p < 0/05$) بوده است. اما بین گروه حفاظتی با شاهد معنی دار نبوده است. قطر لوله های نزدیک در گروه دیابتیک افزایش یافت اما در گروه حفاظتی تقریباً مشابه قطر گروه شاهد بوده است (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۱. اثر استرپتوزتوسین و عصاره هیدروالکلی گزنه بر گلوکز خون در سه گروه موش های صحرایی مورد آزمایش

گروه (n=10)	گلوکز خون (میلی گرم بر دسی لیتر)			هفته پنجم
	قبل از تزریق	هفته اول	هفته سوم	
شاهد	$85/5 \pm 1/7$	$87/5 \pm 1/9$	$90/2 \pm 2/7$	$99/4 \pm 5/0$
دیابتی	$102/9 \pm 3/7$	$214/1 \pm 23/8$	$243/3 \pm 34/8$	$454/7 \pm 34/5$
حفاظتی	$101/1 \pm 2/7$	$277/1 \pm 45/7$	$309/1 \pm 37/4$	$303/6 \pm 100/6$

بین دو گروه (دیابتی و حفاظتی) تفاوت معنی دار دیده می شود ($p < 0/001$).

جدول شماره ۲. اثر استرپتوزتوسین و عصاره هیدروالکلی گزنه بر وزن بدن (گرم) و وزن کلیه (گرم) و

نسبت وزن کلیه به وزن بدن موش های صحرایی مورد آزمایش

گروه (n=10)	وزن بدن (گرم)			نسبت وزن کلیه به وزن بدن
	قبل از تزریق	هفته اول	هفته پنجم	
شاهد	$200/2 \pm 13/4$	$208/4 \pm 12/3$	230 ± 9	$0/42$
دیابتی	$130/9 \pm 10/2$	$125/8 \pm 8/5$	$144/7 \pm 6/8$	$0/51$
حفاظتی	$177/1 \pm 15/8$	$166/0 \pm 11/8$	$175/9 \pm 7/5$	$0/48$

جدول شماره ۳. اثر استرپتوزتوسین و عصاره هیدروالکلی گزنه بر حجم کلیه، مساحت گلومرول، قطر لوله های درهم

پیچیده نزدیک و دور در ۳ گروه موش های صحرایی مورد آزمایش			
گروه شاهد	گروه دیابتی	گروه حفاظتی	
حجم کلیه (میکرومترمکعب)*	۳۲۳/۶±۶۶/۵	۲۵۹/۰±۵۵	۳۱۸/۲±۴۱/۶
نسبت حجم به وزن کلیه	۳۲۳	۳۵۰	۳۹۲
حجم کورتکس (میکرومترمکعب)*	۱۶۶/۱±۲۰/۳	۱۳۹/۶±۳۴/۸	۱۵۶/۱±۷۶/۹
حجم مدولا (میکرومترمکعب)*	۱۲۳/۹±۳۹/۳	۱۰۶/۳±۴۶/۱	۱۳۸/۹±۶۱/۷
نسبت حجم کورتکس به مدون	۱/۳۴	۱/۳۱	۱/۳۰
مساحت گلومرول (میکرومترمربع)	۱۳۳۵/۳±۱۴۵/۳	۱۴۴۱/۸±۱۲۷/۲	۱۳۲۶/۵±۱۶۵/۳
قطر گلومرول (میکرولیت)	۱۵۶/۲±۱۱/۵	۱۶۲/۲±۱۱/۳	۱۵۳/۲±۱۹/۸
قطر لوله نزدیک (میکرومتر)	۱۴/۴±۳	۱۵/۳±۳	۱۴/۴±۳/۴
قطر لوله دور (میکرولیت)	۱۱/۴±۲/۳	۱۱/۴±۲/۳	۱۱/۳±۲/۴

* میانگین ± انحراف معیار

بحث و نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز عصاره برگ گزنه به میزان ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم بصورت تجویز پیش درمانی (قبل از دیابتی شدن) از افزایش قند خون در گروه حفاظتی در مقایسه با گروه دیابتیک می کاهد و همچنین تا حدودی می تواند تغییرات مورفومتریک ناشی از هیپرگلیسمی شامل مساحت گلومرولها، قطر لوله های نزدیک، حجم کورتکس و مدولا و تغییرات هیستوپاتولوژیک را تعدیل نماید. مطالعه راش و همکاران در رت های دیابتیک نشان داد که تغییرات مورفومتریک ناشی از هیپرگلیسمی در گلومرول ها و لوله های نزدیک و دور و وزن و حجم کلیه را در موش های دیابتیک با استفاده از انسولین درمانی تعدیل می گردد (۹). مقایسه نتایج این تحقیق با مطالعه راش (۹) نشان داد که کنترل دیابت می تواند از تغییرات مورفولوژیک در رت ها جلوگیری نماید. مطالعات نشان داده است که یکی از دلایل اصلی بزرگ شدن کلیه بدنال STZ هیپرپلازی است نه هیپرتروفی سلولی (۱۴). از طرفی رابطه معنی داری بین قند خون و اندازه کلیه وجود داشته (۱۵) که این رابطه مستقیم بوده و با افزایش قند خون اندازه و وزن کلیه افزایش می یابد. بنابراین می توان نتیجه گرفت که دیابت وزن کلیه را افزایش می دهد. در این مطالعه اگر چه کاهش نسبت وزن کلیه به وزن بدن در گروه حفاظتی در مقایسه با گروه دیابتی وجود داشت، اما نسبت به گروه شاهد بالاتر بود. راش در یک مطالعه (۹) نشان داد که انسولین نسبت وزن کلیه به وزن بدن را تعدیل

می نماید اما به وزن قبل از دیابت نمی رسد. نتایج مطالعه حاضر مشابه یافته های راش و همکاران می باشد. همچنین افزایش وزن کلیه در رت های بالغ و نابالغ دیابتی شده متفاوت است. در رت های بالغ این افزایش بدلیل هیپرتروفی کلیه و در رت های نابالغ بدلیل رشد طبیعی کلیه است (۱۶) هیپرتروفی اولیه کلیوی در رت های دیابتیک با چندین عامل از جمله: غلظت گلوکز، جریان گلوکز از طریق بخش اکسیداتیو مسیر پنتوز فسفات و همچنین فعالیت دهیدروژناز گلوکز ۶ فسفات رابطه مستقیمی دارد (۱۷). در بسیاری از مطالعات صورت گرفته بر روی مدل های حیوانی بدنال دیابت افزایش وزن - اندازه و حجم کلیه گزارش گردیده است. البته لازم به ذکر است که این افزایش در مراحل مختلف متفاوت می باشد. در مراحل اولیه افزایش و در مراحل نهایی تر نفروپاتی کلیه حجم و اندازه و وزن کاهش نشان می دهد (۱۸). بعد از طبیعی شدن قند خون حجم کلیه کاهش می یابد (۱۴).

در مطالعه حاضر نسبت وزن کلیه به وزن بدن در گروه دیابتی، حفاظتی در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت که دلیل بر بزرگ شدن کلیه است. از آنجا که در مطالعه حاضر گزنه توانست قند خون را تعدیل نماید اما به سطح نرمال نرسید، افزایش وزن کلیه ناشی از دیابت در گروه حفاظتی در مقایسه با گروه دیابتی نسبتا پایین تر بود اما نسبت به گروه شاهد بالاتر بود. در یک مطالعه (۹) وزن کلیه رت ها ده روز بعد از دیابت افزایش یافت و بعد از درمان با

انسولین وزن کلیه کاهش یافت اما به وزن قبل از دیابت نرسید. نسبت حجم کورتکس به مدولا در گروه دیابتی و حفاظتی کمتر از گروه کنترل می باشد. کاهش این نسبت شاید بدلیل مراحل اولیه ایجاد نفرواسکلروز ناشی از دیابت باشد (۱۹) و از سویی دیگر افزایش مدولا را نشان می دهد. این یافته در بیماران دارای فشار خون نیز گزارش شده است که نسبت حجم کورتکس به مدولا کاهش می یابد (۱۹).

افزایش حجم مدولا و بالطبع کاهش نسبت کورتکس/ مدولا در رت های دیابتی ممکن است به علت افزایش در بافت پارانشیم کلیوی و هم چنین افزایش در مجاری و لوله ها باشد و اصولاً بزرگی کلیه در دیابت اغلب تلفیق هیپرتروفی لوله ای و هیپرپلازی لوله ای و هیپرپلازی و گسترش فضای بینابینی است که این موارد پاسخی به افزایش فیلتراسیون مایعات و گلوکز و باز جذب فعال آنها می باشد (۲۰). از آنجا که در جریان رشد کلیه در طی دیابت گلومرول ها فقط بخش کوچکی (کمتر از ۱ درصد) از حجم کورتکس را اشغال می کند. لذا بزرگی کلیه بطور غالب وابسته به تغییرات لوله ای بینابینی است (۲۰). در این مطالعه افزایش حجم مدولا و بالطبع کاهش نسبت کورتکس/ مدولا در گروه دیابتی و حفاظتی مشاهده گردید که افزایش لوله ها نیز موید این تغییر می باشد. با وجود این بنظر می رسد گزنه تا حدودی افزایش قطر گلومرول ها را مهار کند. مساحت و قطر گلومرول ها و قطر لوله های نزدیک توسط عصاره در گروه حفاظتی در مقایسه با گروه دیابتی تعدیل شده بود. تحقیقات روی مورفولوژی گلومرول ها در دیابت بیانگر ارتباط مستقیم بین ساختار و عملکرد است که توجه آسیب شناسان ابتدا به افزایش ضخامت غشا پایه جلب شده و سپس تعداد و حجم گلومرولی مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۱).

مهم ترین بخش عملکردی آسیب پذیر در نفروپاتی کلیه گلومرول ها می باشد (۲۲ و ۲۳) یکی از مکانیسم های علل افزایش گلومرول تکامل عروق خونی (مویرگ) های جدید است که این عامل پودوسیت ها را برای افزایش تعداد زواید جهت همپوشانی مویرگ ها تحریک می کند. به همین دلیل اندازه و حجم گلومرول و

طبعاً حجم کلیه افزایش می یابد (۲۴) کاهش حجم گلومرول پس از درمان بدلیل کاهش تعداد عروق است. همچنین غشای پایه اضافی در گلومرول ها و مزائزال جمع می گردد (۹) این آسیب در مطالعه حاضر نیز دیده شد. در این مطالعه عصاره گزنه در گروه حفاظتی توانست از افزایش مساحت و اندازه گلومرول ها در مقایسه با گروه دیابتی جلوگیری نماید و این کاهش از نظر آماری معنی دار بوده است. درمان با انسولین در موش های دیابتیک توانست تغییرات مورفومتریک گلومرولها را تعدیل نماید (۹). در این مطالعه همچنین عصاره گزنه توانست قطر لوله های نزدیک را نسبت به گروه دیابتی را کاهش داده و به قطر گروه شاهد نزدیک نماید که نشانگر تاثیر عصاره گزنه بوده است. علل تغییرات لوله های درهم پیچیده نزدیک بدنبال دیابت به طور کامل مشخص نشده است. اما چندین عامل مانند فاکتورهای رشد شامل فاکتور رشد شبه انسولینی در آن نقش دارند (۲۵ و ۲۶) کاهش فیلتراسیون گلومرولی مقدار مایع کمتری وارد لوله ها برای باز جذب می نماید (۲۷ و ۲۸).

گیاه گزنه بدلیل داشتن فلاونوئید دارای فعالیت آنتی اکسیدانت می باشد. از آنجا که استرس اکسیداتیو یکی از مکانیزمهای پاتوفیزیولوژیکی پیشرفت تغییرات هیستولوژیکی کلیه است (۸)، تصور می گردد کنترل تغییرات ساختاری کلیه شده می تواند ناشی از فلاونوئیدها، پپتیدها و آمین ها، کومارین و یون های معدنی به مقدار بالای ۲٪ در برگ گیاه گزنه باشد (۲۹-۳۲).

نتایج این مطالعه نشان داد که مصرف عصاره گیاه بصورت حفاظتی قبل از ایجاد دیابت در موش صحرایی دارای اثرات تعدیل کننده قند خون بوده و می تواند تا حدودی تغییرات مورفومتریک کلیه شامل مساحت و قطر گلومرول ها قطر لوله های نزدیک و حجم کورتکس و مدولا را تعدیل نماید و همچنین از تغییرات هیستوپاتولوژیک کلیه جلوگیری نماید.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی گلستان به خاطر حمایت مالی اجرای این مطالعه تشکر و قدردانی می گردد.

References

1. American Association of Diabetes Educators. Intensive diabetes management: implications of the DCCT and UKPDS. Diabetes Educ 2002; 28(5): 735-40.

2. Hunt LM, Arar NH, Akana LL. Herbs, prayer, and insulin. Use of medical and alternative treatments by a group of Mexican American diabetes patients. *J Fam Pract* 2000; 49(3): 216-23.
3. Ryan EA, Pick ME, Marceau C. Use of alternative medicines in diabetes mellitus. *Diabetes Med* 2001; 18(3): 242-5.
4. Zargari A. Medicinal plants, 6th ed, Tehran, Tehran University of Medical Sciences 1996; pp: 401-9. [in Persian]
5. Kavalali G, Tuncel H, Goksel S, Hatemi HH. Hypoglycemic activity of *Urtica pilulifera* in streptozotocin-diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2003; 84(2-3): 241-5.
6. Wagner H, Willer F, Samtleben R, Boos G. Search for the antiprostatic principle of stinging nettle (*Urtica dioica*) roots. *Phytomedicine* 1994; 1: 213-24.
7. Emmelin N, Feldberg W. Distribution of acetylcholine and histamine in nettle plants. *New Phytol* 1949; 48: 143-8.
8. Feldman EL, Stevens MJ, Greene DA. Pathogenesis of diabetic neuropathy. *Clinic Neurosc* 1997; 4: 365-70.
9. Rasch R, Dorup J. Quantitative morphology of the rat kidney during diabetes mellitus and insulin treatment. *Diabetologia* 1997; 40(7): 802-9.
10. Tuttle KR, Bruton JL. Effect of insulin therapy on renal hemodynamic response to amino acids and renal hypertrophy in non-insulin-dependent diabetes. *Kidney International* 1992; 42(1): 167-73.
11. Golalipour MJ, Khoori V. Protective effect of the hydroalcoholic extract of *Urtica dioica* leaves on blood glucose concentration and β -cells in hyperglycemic rats. *J Babol Univ Med Sci* 2007; 9(1): 7-13. [in Persian]
12. Gundersen HJG, Bagger P, Bendtsen TF, et al. The new stereological tools: disector, fractionator nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988; 96(10): 857-81.
13. Schmitz A, Nyengaard JR, Bendtsen TF. Glomerular volume in type 2 (noninsulin-dependent) diabetes estimated by a direct and unbiased stereologic method. *Lab Invest* 1990 62(1): 108-13.
14. Seyer Hansen K, Hansen J, Gundersen HJ. Renal hypertrophy in experimental diabetes. A morphometric study. *Diabetologia* 1980; 18(6): 501-5.
15. Gotzsche O, Gundersen HJ, Osterby R. Irreversibility of glomerular basement membrane accumulation despite reversibility of renal hypertrophy with islet transplantation in early experimental diabetes. *Diabetes* 1981; 30(6): 481-5.
16. Pette D, Luh WW, Bucher T. Comparable and specific proportions in the mitochondrial enzyme activity pattern. *Biochem Biophys Res Commun* 1962; 7: 419-24.
17. Steer KA, Sochor M, Gonzalez AM, McLean P. Regulation of pathways of glucose metabolism in kidney: specific linking of pentose phosphate pathway activity with kidney growth in experimental diabetes and unilateral nephrectomy. *FEBS Lett* 1982; 150(2): 494-8.
18. Tuttle KR, Bruton JL, Perusek MC, Lancaster JL, Kopp DT, DeFronzo RA. Effect of strict glycemic control on renal hemodynamic response to amino acids and renal enlargement in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1991; 324(23): 1626-32.
19. Kojima S, Shida M, Tanaka K, Takano H, Yokoyama H, Kuramochi M. Renal macrostructure and cortical circulation in hypertension assessed by dynamic computed tomography. *Am J Hypertens* 2001; 14(6 Pt 1): 516-23.

20. Seyer Hansen K. Renal hypertrophy in experimental diabetes: a comparison to compensatory hypertrophy. *Diabetologia* 1978; 14: 325-8.
21. Osterby R. Glomerular structural changes in type I [insulin –dependent diabetes mellitus]: causes, consequences and prevention. *Diabetologi* 1992; 35(9): 803-12.
22. Lundbaek K. Nephropathy in diabetic subjects. In: Leibel BS, Wrenshall GA. On the nature and treatment of diabetes. 1st ed, Amsterdam, Excerpta Media Foundation 1965; pp: 436-46.
23. Mogensen CE, Christensen CK, Vittinghus E. The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes* 1983; 32: 64-78.
24. Rasch R, Norgaard JO. Renal enlargement: comparative autoradiographic studies of 3H-thymidine uptake in diabetic and uninephrectomized rats. *Diabetologia* 1983; 25(3): 280-7.
25. Flyvbjerg A, Bornfeldt KE, Marshall SM, Arnqvist HJ, Orskov H. Kidney IGF-I mRNA in initial renal hypertrophy in experimental diabetes in rats. *Diabetologia* 1990; 33(6): 334-8.
26. Flyvbjerg A, Frystyk J, Marshall SM. Additive increase in kidney insulin-like growth factor I and initial renal enlargement in uninephrectomized-diabetic rats. *Horm Metab Res* 1990; 22(10): 516-20.
27. Rasch R. Kidney Na, K-ATPase activity in streptozotocin- diabetic rats. *Scan J Clin Lab Invest* 1986; 46(1): 59-62.
28. Wald H, Scherzer P, Popovtzer MM. Enhanced renal tubular ouabain-sensitive ATPase in streptozotocin diabetes mellitus. *Am J Physiol* 1986; 251(1Pt 2): 164-70.
29. Farzami B, Ahmadvand D, Vardasbi S, Majin FJ, Khaghani Sh. Induction of insulin secretion by a component of *Urtica dioica* leave extract in perfused Islets of Langerhans and its in vivo effects in normal and streptozotocin diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2003; 89(1): 47-53.
30. Ellnain WM, Bylka W, Kowalewski Z. Flavonil compounds in *Urtica dioica*. *Herba Pol* 1986; 32(4): 131-7.
31. Adamski R, Bieganska J. Investigation on substances present in *urtica dioica* L. leaves. part 2. analysis of proteins, amino acids and nitrogen non-protein substances. *Herba Pol* 1984; 30(1): 7-26.
32. Rossiikaya GI, Dargaeva TD, Brutko LI, Nikoleav SM. Study of the extraction process and determination of the same of biologically active compounds in the total bile expelling agent. *Farmasiya Moscow* 1985; 34(1): 38-41.

PROTECTIVE EFFECT OF URTICA DIOICA ON RENAL MORPHOMETRIC AND HISTOLOGIC ALTERATIONS IN STREPTOZOTOCIN DIABETIC RATS

M.J. Golalipour (PhD)^{1*}, A. Mohammad Gharravi (MSc)², S. Ghafari (MSc)²,
R. Azarhoush (MD)³

1. *Professor of Anatomy Department, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran, mjgolalipour@yahoo.com, 2. MSc in Anatomy, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran, 3. Assistant Professor of Pathology Department, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Hyperglycemia causes renal morphometric and histological alterations. This study was done to determine the protective role of urtica dioica on renal morphometric and histological alterations in streptozotocin diabetic rats.

METHODS: Thirty adult Wistar rats divided into three groups. Group I normal control group, group II: diabetic group; animal received 80 mg/kg STZ (streptozotocin) by intraperitoneally and group III: protective group, rats received 100 mg/kg daily hydroalcoholic extract of U. dioica for 5 days then diabetes induced in animals by STZ. In the end of five weeks the animals had been scarified, the kidneys fixed by buffer formaldehyde, processed, sectioned and stained with H&E.

FINDINGS: Mean of blood glucose concentrations in end of fifth weeks were 99.4, 454.7 and 303.6 in control, diabetic and protective groups, respectively ($p < 0.05$), that was lower in protective group than diabetic group. Ration of kidney/body weight in control, diabetes and protective group were 0.42, 0.51 and 0.48, respectively ($p < 0.05$). Glomerular area in control, diabetes and protective group were 1335.3, 1441.8 and 1326.4 μm^2 , respectively ($p < 0.05$). Glomerular diameter in diabetic group (162.2 μm) was higher than control (156.1) and protective group (153.2). Pathology finding as glomerular sclerosis was seen in diabetic group but this finding did not observe in control and protective groups.

CONCLUSION: This study demonstrated that administration of urtica dioica before streptozotocin-induced diabetes has protective effects on blood glucose, renal morphometric and histological alterations in streptozotocin diabetic rats.

KEY WORDS: *Urtica dioica*, Diabetes, Blood glucose, Kidney, Glomerular, Hyperglycemia, Streptozotocin.

Journal of Babol University of Medical Sciences 2009; 10(6): 43-22

Received: July 13th 2008, Revised: September 17th 2008, Accepted: November 3rd 2008.