

تأثیر تمرین هوازی همراه با مکمل نانوآوژنول بر بافت ناحیه گانگلیون ریشه پستی و فاکتورهای التهابی در رت‌های مدل دیابتی به صورت نیمه تجربی

عباس شارق‌ی بروجنی^۱، خسرو جلالی دهکردی^۲، غلامرضا شریفی^۳، فرزانه تقیان^۴، زهره مظاهری^۵

تاریخ دریافت ۱۳۹۹/۱۱/۳۰ تاریخ پذیرش ۱۳۹۹/۰۳/۳۰

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: دیابت یکی از بیماری‌های مهم است که کیفیت زندگی افراد را به شدت کاهش می‌دهد و تخریبات نوروپاتی یا آسیب‌های عصبی ناشی از افزایش اکسیداسیون ناقص را به دنبال دارد. نانوآوژنول یک مکمل گیاهی با خاصیت آنتی‌اکسیدانسی بالاست. هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر تمرین هوازی همراه با مکمل دهی نانوآوژنول بر فاکتورهای التهابی TNF-a و IL-1B و تغییرات هیستولوژیک ناحیه گانگلیون ریشه پستی^۶ (DRG) رت‌های دیابتی بود.

مواد و روش کار: ۲۵ سر رت نر نژاد ویستار ۸ هفته‌ای، به ۵ گروه: گروه کنترل سالم، گروه کنترل دیابتی، گروه دیابت+تمرین ورزشی، گروه دیابت+نانوآوژنول و گروه دیابت+تمرین ورزشی+نانوآوژنول تقسیم شدند. مدل دیابت با استفاده از استروپتوزوتوسین به صورت صفاقی به گروه‌های مربوطه، القا شد. مکمل نانوآوژنول نیز روزانه به موش‌های گروه‌های مربوطه به وسیله لوله از گلو به معده موش وارد شد. گروه‌های تمرینی نیز به مدت ۸ هفته، ۵ روز در هفته با سرعت ۳۰ متر بر دقیقه به تمرین ورزشی پرداختند.

یافته‌ها: القای دیابت با استفاده از استروپتوزوتوسین^۷ (STZ) سبب به هم ریختن انسجام بافتی و سلولی در ناحیه DRG شد. در بررسی تغییرات ژنی نیز مشخص شد که فاکتورهای التهابی TNF-a و IL-1B افزایش معنی‌داری در ناحیه DRG در گروه دیابت نسبت به گروه کنترل را نشان داده‌اند ($p=0.001$) برای هر دو متغیر. در بررسی مدالیته‌های درمانی نیز مشخص شد که تنها گروه دیابت+تمرین ورزشی+نانوآوژنول کاهش معنی‌داری را در TNF-a نسبت به گروه دیابت نشان داد ($p=0.001$).

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج مطالعه حاضر به نظر می‌رسد استفاده از مکمل نانوآوژنول در کنار تمرین ورزشی در کنترل تخریبات عصبی دیابت با تنظیم منفی فاکتور التهابی TNF-a به‌ویژه در ناحیه DRG مؤثر باشد.

کلیدواژه‌ها: تمرین هوازی، نانوآوژنول، TNF-a، IL-1B، دیابت

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و یکم، شماره پنجم، ص ۴۰۹-۳۹۸، مرداد ۱۳۹۹

آدرس مکاتبه: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران، تلفن: ۰۹۱۳۱۸۵۴۹۹۷

Email: khosrojalali@gmail.com

مقدمه

است که جمعیت بالایی از افراد دنیا را در سنین مختلف به خود مبتلا کرده است (۲). تخریبات مختلف ناشی از دیابت در بدن انسان سبب کاهش کیفیت زندگی در افراد می‌شود (۳). از جمله این تخریبات نوروپاتی یا آسیب‌های عصبی ناشی از دیابت می‌باشد (۴).

کاهش تحرک، رژیم غذایی نامناسب و افزایش استرس‌های محیطی باعث کاهش مقاومت بدنی و گسترش بیماری‌های متابولیکی از جمله دیابت می‌شوند (۱). دیابت از جمله بیماری‌هایی

^۱ گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران

^۲ گروه فیزیولوژی ورزش، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران (نویسنده مسئول)

^۳ گروه فیزیولوژی ورزش، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران

^۴ گروه فیزیولوژی ورزش، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران

^۵ آزمایشگاه هیستونونک، تهران، ایران

^۶ Dorsal Root Ganglia

^۷ Streptozotocin

مطالعات متعدد به بررسی نوروپاتی ناشی از دیابت پرداخته‌اند. با این وجود پاتونز دقیق نوروپاتی دیابتی هنوز ناشناخته است. گزارش شده است که افزایش قند خون ناشی از بیماری دیابت منجر به گسترش استرس اکسیداتیو (۵)، بیش فعال بودن مسیر پلویول (۶)، افزایش محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته (۷)، هیپوکسی عصبی / ایسکمی (۸)، کمبود اسید لینولیک (۹)، افزایش در پروتئین کیناز C (۱۰) و کمبود فاکتور رشد (۱۱) و افزایش التهاب (۱۲) می‌شود. این مسیرها همگی در تولید استرس اکسیداتیو و گسترش التهاب دخیل هستند. به نظر می‌رسد استرس اکسیداتیو و التهاب در گانگلیون ریشه پستی (DRG) شدیدتر بوده و تخریبات بیشتری بر جای گذارد (۱۳).

مطالعات متعدد به بررسی فاکتورهای التهابی درگیر در بیماری‌های عصبی ناشی از دیابت پرداخته‌اند. پروتئین‌های التهابی، مانند فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF- α) و اینترلوکین ۱ بتا (IL-1B) به عنوان واسطه درد نوروپاتیک و آسیب‌های عصبی ناشی از دیابت شناخته شده‌اند (۱۴، ۱۵). این پروتئین‌ها عملکردهای مختلفی را انجام می‌دهند (۱۵-۱۷)؛ با این حال، تغییرات آن‌ها در DRG در مراحل مختلف آسیب‌های عصبی و دردهای نوروپاتی ناشناخته است. اخیراً Zhu و همکاران (۲۰۱۹) در مطالعه خود تنظیم افزایشی فاکتورهای التهابی TNF- α را در DRG و نخاع^۱ را در رت‌ها با درد نوروپاتی دیابتی تأیید کردند (۱۸). نشان داده شده که هر دو دیابت نوع ۱ و نوع ۲ با تنظیم مزمن سیتوکین‌های التهابی همراه است با این وجود مطالعات در رابطه با بررسی فاکتورهای التهابی به ویژه IL-1B در ناحیه عصبی محدود می‌باشد. IL-1B بافت‌های مختلف بدن به عنوان یک پروتئین پیش التهابی شناخته شده و می‌تواند تخریبات بافتی ناشی از التهاب را گسترش دهد (۱۹). از جمله راهکارهای مقابله با آسیب‌های التهابی ناشی از دیابت افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانسی یا استفاده از مکمل‌های حاوی اسید فنولیک می‌باشد.

تأثیر التهاب و استرس اکسیداتیو در ریشه عصب و گانگلیون ریشه پستی بسیار مهم است زیرا خون‌رسانی و ظرفیت ترمیم در این مناطق کم است (۲۰). ROS توسط آنتی‌اکسیدان‌هایی کنترل می‌شود. از جمله راهکارهای مقابله با آسیب‌های التهابی ناشی از دیابت افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانسی یا استفاده از مکمل‌های حاوی اسید فنولیک می‌باشد. نشان داده شده که اوژنول از جمله مکمل‌های گیاهی بوده که ظرفیت آنتی‌اکسیدانسی بالایی دارد (۲۱). اوژنول (4-allyl-2-metoxoxhenhe) یک ترکیب فنلی طبیعی است که از میخک، ریحان و جوز هندی استخراج می‌شود. در مورد این

ترکیب چندین فعالیت بیولوژیکی مانند آنتی‌اکسیدان (۲۲)، اثرات محافظت‌کننده عصبی (۲۳) و فعالیت ضد باکتریایی در برابر هر دو میکروارگانیسم‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان داده است (۲۳). علاوه بر این، از آن به عنوان ماده معطر و خوشبوکننده در انواع محصولات غذایی و آرایشی استفاده شده است (۲۴). همان‌طور که بیان شد اوژنول یک آنتی‌اکسیدان قوی در نظر گرفته می‌شود که انواع مختلف ROS را در بسیاری از حالات پاتوفیزیولوژیک سم‌زدایی می‌کند. بیان شده که اوژنول به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم به سیستم‌های آنتی‌اکسیدانسی و ضد آپوپتوز کمک می‌کند (۲۵). لذا می‌تواند تخریبات اکسایشی عصبی ناشی از دیابت را نیز کنترل کند. از دیگر تأثیرات اوژنول بر کنترل تخریبات ناشی از دیابت اسیدفنولیک آن می‌باشد. بیان شده که اسیدهای فنولیک متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که معمولاً در بسیاری از ترکیبات غذایی و میوه‌ها یافت می‌شوند. بسیاری از مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده‌اند که مصرف غذاها و نوشیدنی‌هایی که محتوای فنولی زیادی هستند با پیشگیری از دیابت همراه است (۲۶). لذا استفاده از این مکمل به‌ویژه به‌صورت نانو می‌تواند در کنترل تخریبات عصبی ناشی از دیابت مؤثر باشد. استفاده از نانو مواد (ذراتی که یک حداقل بعد آن‌ها در حد نانومتر باشد) منجر به افزایش نفوذپذیری در شرایط در شیشه و یا در حیوان می‌شود که به دنبال آن افزایش تأثیر ماده مؤثره را در بر دارد. همچنین به دلیل افزایش پایداری دارو و ترکیبات نانو شده علاقه به استفاده از این تکنولوژی رو به افزایش است (۲۷، ۲۸).

فعالیت بدنی طیف وسیعی از مزایا را ارائه می‌دهد که برای کنترل بسیاری از بیماری‌ها مؤثر می‌باشد (۲۹). برخی از برنامه‌های تمرینات ورزشی قادر به کنترل التهاب در بافت عصبی هستند (۳۰). در بیماری دیابت نشان داده شده که انجام تمرینات ورزشی استقامتی قادر به بهبود دردهای نوروپاتیک و بهبود متابولیسم بافت عصبی با افزایش فاکتورهای نوروتروفیک می‌باشند (۳۱، ۳۲). با این وجود مکانیسم‌هایی که ورزش سبب بهبود بسیاری از مسیرهای مولکولی تخریب‌شده در اثر بیماری می‌شود، به‌خوبی درک نشده است. در تحقیقات مختلف نشان داده شده است که تمرین ورزشی قادر به کنترل فاکتورهای التهابی TNF- α و IL1B در بافت عصبی می‌باشد.

امروز در مطالعات متعدد از مکمل‌های گیاهی در کنار تمرین ورزشی برای کنترل تخریبات دیابت استفاده می‌شود (۳۳، ۳۴). از آنجایی که تمرین ورزشی تأثیرات ضدالتهابی دارد (۳۵) و از سوی دیگر با توجه به پتانسیل استفاده از نانو امولسیون‌ها به عنوان

¹ Spinal cord

تقویت‌کننده نفوذ و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اوژنول استفاده از یک فرآورده مبتنی بر نانو امولسیون اوژنول می‌تواند وسیله انتقال مناسبی به محل موردنظر باشد. تاکنون هیچ مطالعه‌ای به بررسی اثر ترکیبی تمرین ورزشی و تجویز نانو اوژنول نپرداخته است. لذا پژوهش حاضر تأثیر تمرین ورزشی در کنار مکمل گیاهی اوژنول (به‌صورت نانو) را بر تخریبات ایجاد شده ناشی از دیابت بر سلول‌ها و بافت ناحیه DRG و کنترل فاکتورهای التهابی TNF- α و IL-1B در رت‌های دیابتی مدل را در مقایسه با هر یک از آن‌ها به‌تنهایی به‌صورت نیمه تجربی موردبررسی قرار داد.

مواد و روش کار

روش کار و گروه‌بندی حیوانات:

پژوهش حاضر از نوع نیمه تجربی طراحی بود. ۲۵ سر رت نر نژاد ویستار ۸ هفته‌ای از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. پس از انتقال رت‌ها به محیط جدید حیوانات در شرایط کنترل‌شده با ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی (شروع روشنایی ۶ صبح و شروع خاموشی ۶ عصر)، دما (۲۲±۳ سانتی‌گراد)، و رطوبت (حدود ۴۵ درصد) نگهداری شدند. تعداد سه تا پنج عدد رت در قفس‌هایی از جنس پلکسی گلاس با درب توری و به ابعاد ۲۵ در ۲۷ در ۴۳ سانتی‌متر به‌گونه‌ای نگهداری شدند که آزادانه به آب و غذای استاندارد دسترسی داشته باشند. تمامی مراحل نگهداری و کشتار رت‌ها بر اساس ضوابط کمیته اخلاقی حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی انجام شد. حیوانات با وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم پس از یک هفته آشناسازی با محیط آزمایشگاه به‌صورت تصادفی به ۵ گروه تقسیم شدند (هر گروه واجد سه حیوان): گروه کنترل سالم، گروه کنترل دیابتی، گروه دیابت+تمرین ورزشی، گروه دیابت+نانوآوژنول و گروه دیابت+تمرین ورزشی+نانوآوژنول.

دیابتی کردن موش‌های ویستار:

از داروی استرپتوزوتوسین برای دیابتی کردن حیوانات استفاده شد. به‌این‌ترتیب که ۳ میلی‌گرم از این دارو به ازای ۱۰۰ گرم وزن موش به‌صورت تزریق داخل صفاقی تزریق شد. قند خون حیوانات پس از یک هفته اندازه‌گیری شد و حیوانات دارای قند خون بیشتر از ۱۵۰ mg / kg دیابتی در نظر گرفته شدند (۳۶).

تهیه نانوذره اوژنول:

ماده اوژنول به‌صورت خالص‌شده از شرکت سیگما خریداری گردید و در DMSO حل شد. نانوذره طبق پروتکل با غلظت ده درصد تهیه شد. به‌طور خلاصه روغن اوژنول و توئین ۲۰ (سورفاکتانت غیر یونی) آهسته و در شرایطی که به آرامی روی همزن هم زده می‌شدند با هم مخلوط شدند تا جاییکه همگن شدند. سپس آب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قطره قطره به مخلوط اضافه شد. این مخلوط تحت اولتراسوند به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند (۲۷). پس از تهیه مکمل به‌صورت نانو، میزان ۲ ml روزانه در ساعات یکسان و مشابه با پروتکل تمرین ورزشی (۵ روز در هفته به مدت ۸ هفته) (۳۷) به گروه‌های دیابت+نانوآوژنول و گروه دیابت+تمرین ورزشی+نانوآوژنول به‌وسیله لوله از گلو به معده موش وارد شد.

پروتکل تمرینی:

رت‌های گروه‌های دیابت+تمرین و دیابت+مکمل+تمرین به مدت ۸ هفته و هفته‌ای ۵ جلسه پروتکل تمرین را انجام دادند که به تدریج و طبق زمانبندی (به شرح جدول زیر) بر سرعت و مدت زمان تمرین اضافه شد. سایر گروه‌ها در مدت اجرای پروتکل در شرایط آزمایشگاه نگهداری شدند.

جدول (۱): برنامه تمرین

هفته‌ها	سرعت / متربر دقیقه	مدت تمرین / دقیقه
اول	۸	۵
دوم	۱۰	۱۰
سوم	۱۰	۱۴
چهارم	۱۴	۱۸
پنجم	۱۴	۲۲
ششم	۱۷	۲۶
هفتم	۲۰	۳۰
هشتم	۲۰	۳۰

لازم به ذکر است در طول برنامه تمرینی از هیچ گونه شوک تمرینی استفاده نشد و در صورت لزوم با استفاده از دست و یا ایجاد

محرك صوتی بر روی درپوش ریل‌های نوارگردان، حیوانات مجبور به ادامه تمرین شدند.

ارزیابی‌های بافتی:

پس از ۸ هفته، کلیه رت‌ها با تزریق کتامین (۷۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلارین (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) بیهوش و کشته شدند. سپس ناحیه گانگلیون ریشه پشتی به طول دو سانتی‌متر قطع گردید و بخشی از بافت در پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت یک شبانه روز و بخشی دیگر در فریزر -۸۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از مرحله تثبیت اولیه، برش ۵ میکرومتری از ناحیه گانگلیون پشتی نخاع تهیه و با روش H&E رنگ آمیزی شد (۳۸) و با میکروسکوپ نوری (ZEISS®) مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد سلول‌های گانگلیونی در عکس‌های میکروسکوپی با استفاده از نرم‌افزار Image J (Image J Software, NIH) شمارش و ثبت شد.

بررسی مولکولی بافت گانگلیونی ریشه پشتی نخاع با روش Real Time PCR

جهت بررسی‌های مولکولی در سطح بیان ژن، ابتدا استخراج RNA از بافت‌ها در همه گروه‌های مورد بررسی، طبق پروتکل شرکت سازنده (کیژن، آلمان) انجام گرفت. برای این کار، میزان ۲۰۰ لاندا کیازول به نمونه‌ها اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای -۸۰ انکوبه شد. پلاک موجود در کرایوتیوب در حالت نیمه انجماد خرد شد و سپس میزان ۱۰۰ لاندا کلروفرم به مدت ۱ دقیقه به آن‌ها اضافه شد. محلول حاصل، با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه

سانتریفیوژ گردید. مایع شفاف قسمت بالایی لوله که حاوی RNA بود به آرامی برداشته و در یک میکروتیوب DEPC شده قرار داده شد. ۱ سی سی ایزوپروپانول بر روی RNA شفاف ریخته شد و به مدت ۱ دقیقه با دست به هم زده شد. نمونه‌ها در سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. سپس مایع رویی دور ریخته شد و روی رسوب آن ۱ سی سی الکل ۷۰ درصد اضافه گردید. پس از Vortex کردن، مخلوط در سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۵۰۰ قرار گرفت. مایع رویی تخلیه گردید و پلاک در داخل میکروتیوب خشک شد. میزان ۲۰ لاندا آب مقطر ۶۰ درجه بر روی پلاک ریخته شد و به مدت ۵ دقیقه بر روی صفحه‌ی ۶۰ درجه قرار داده شد. پس از استخراج RNA با خلوص و غلظت بالا از تمامی نمونه‌های مورد مطالعه، مراحل سنتز cDNA طبق پروتکل شرکت سازنده (Fermentas, USA) انجام گرفت و سپس cDNA سنتز شده جهت انجام واکنش رونویسی معکوس مورد استفاده قرار گرفت. اندازه‌گیری سطوح بیان TNF-a و IL-1B از روش کمی Real time-PCR انجام شد. از ژن گلیسرآلدهید-۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) به عنوان ژن کنترل استفاده گردید و میزان بیان ژن مورد نظر با فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول شماره ۲ گزارش شده است. طراحی پرایمرها بر اساس اطلاعات ژن‌های TNF-a و IL-1B و GAPDH در بانک ژنی NCBI و توسط شرکت ماکروژن انجام شد.

جدول (۲): توالی پرایمرها

شماره دستیابی	توالی الیگو نوکلئوتید 3'-5'	نام ژن
NM_012675.3	5' GAGATGTGGAAATGGCAGAGGA 3' F 5' R GAGAAGATGATGTGAGTGTGAGG 3'	TNF-a
NM_031512.2	5' TGTGACTGGTGGGATGATGA 3' F 5' R GTTCTGTCTATTGAGGTGGAGA 3'	IL-1B
XM_017593963.1	F 5' CAT ACT CAG CAC CAG CAT CAC C 3' 5' AAG TTC AAC GGC ACA GTC AAG G 3' R	GAPDH

آزمون آماری:

از میانگین و انحراف استاندارد برای گزارش توصیفی داده‌ها استفاده شد. پس از تأیید نرمال بودن داده‌ها با آزمون شاپیرو-ویلک، به منظور تعیین معنادار بودن تفاوت میانگین متغیرهای گروه‌های تحقیق، از آزمون‌های آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و تست

تعیینی توکی استفاده شد. اطلاعات مورد نیاز پس از جمع‌آوری، به وسیله نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۲ در سطح معناداری حداقل $P \geq 0.05$ تجزیه و تحلیل شد.

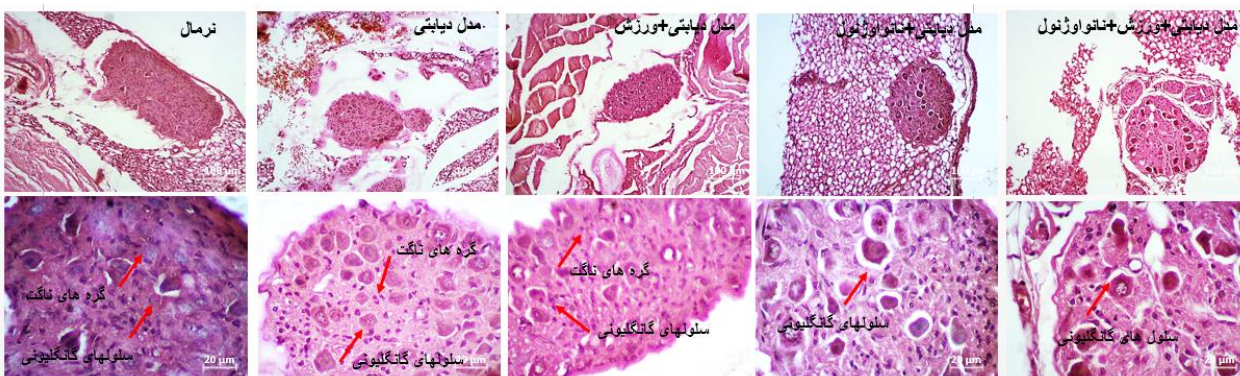
یافته‌ها

تغییرات بافتی:

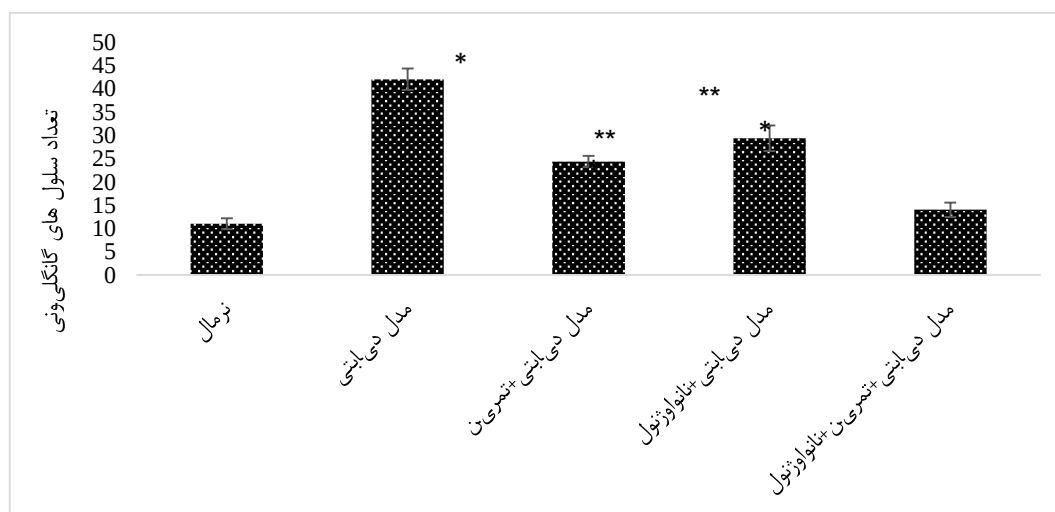
تغییراتی بافتی ناحیه DRG در گروه‌های مختلف پژوهش در شکل ۱ نشان داده شده است. با توجه به تصاویر H&E القای دیابت سبب تخریب و اختلال در نظم سلول‌های گانگلیون در ناحیه DRG شده است؛ این در حالی بود که انجام تمرین ورزشی به‌تنهایی و همچنین مصرف مکمل نانوآوژنول به‌تنهایی قادر به کنترل این شرایط تخریبی بوده‌اند. همچنین گروه درمان ترکیبی نیز بهتر از

گروه‌های تمرین و مکمل به‌تنهایی در انسجام بافتی مؤثر بوده است. در بررسی تعداد سلول‌ها (شمارش سلولی از تصاویر بافتی) نیز مشخص شد که گروه دیابتی شده افزایش بیش از حد و معنی‌داری در تعداد این سلول‌ها داشته‌اند (نسبت به گروه کنترل $p=0.001$)، این در حالی بود که تمرین ورزشی و مکمل به‌تنهایی ($p=0.001$) و یا در ترکیب با هم ($p=0.001$)، بیشترین کنترل را بر جمعیت سلول‌های گانگلیونی داشت (شکل ۱ الف و ب).

الف



ب



شکل (۱): تغییرات هیستولوژیک DRG (الف) و تعداد سلول‌های گانگلیونی (ب). داده‌ها به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد نشان داده شده‌اند. نتایج به‌دست آمده از بررسی ۱۲ موش در هر گروه. * نشان دهنده تفاوت معنی دار ($p \leq 0.05$) در مقایسه با گروه کنترل و ** نشان دهنده تفاوت معنی دار ($p \leq 0.05$) در مقایسه با گروه مدل دیابتی است.

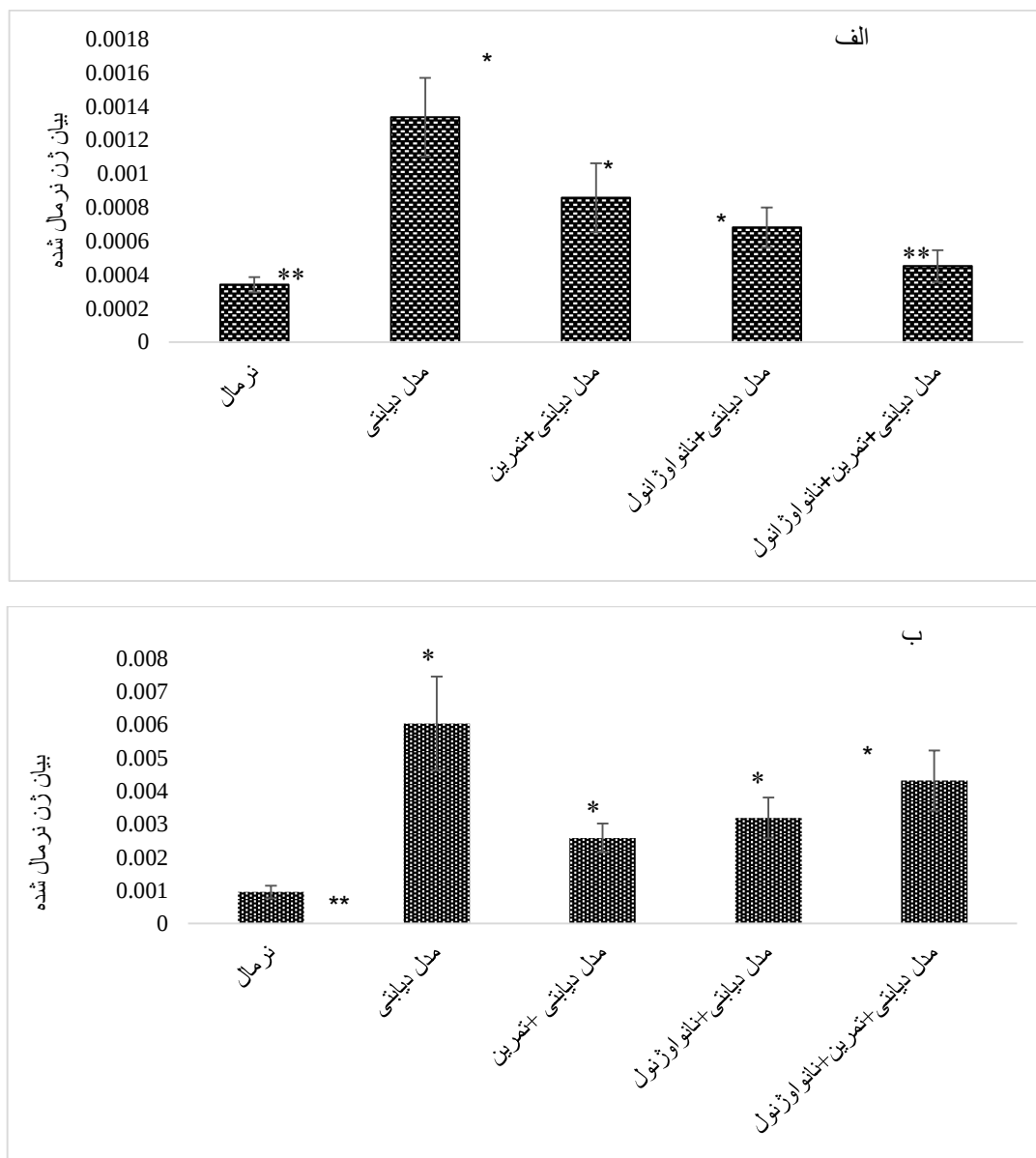
تغییرات بیان ژنی در گروه‌های مختلف پژوهش:

تغییرات ژن‌های التهابی در ناحیه DRG نیز در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که mRNA TNF- α در گروه دیابت افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل سالم دارد

($p=0.001$). این در حالی بود که سایر گروه‌های دیابتی تحت ورزش و نانو آوژنول تغییرات معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان ندادند. در مقایسه با گروه دیابت نیز تنها گروه دیابت + تمرین + نانوآوژنول کاهش معنی‌داری را در TNF- α نشان داد ($p=0.001$).

شد که هر چند گروه‌های تمرین ورزشی، مکمل نانوآوژنول یا گروه ترکیبی سبب کاهش mRNA IL-1B در DRG رت‌های دیابتی می‌شوند اما این تغییرات نسبت به گروه دیابت معنی دار نبود.

در بررسی mRNA IL-1B نیز مشخص شد که دیابت در ناحیه DRG، سبب افزایش معنی دار این فاکتور نسبت به گروه کنترل سالم می‌شود ($p=0.001$). در مقایسه گروه‌های درمانی نیز مشاهده



شکل (۲): تغییرات ژن‌های TNF-α (الف) و IL-1β (ب) در گروه‌های مختلف پژوهش. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد نشان داده شده‌اند. نتایج به دست آمده از بررسی ۱۲ موش در هر گروه. * نشان دهنده تفاوت معنی دار ($p \leq 0.05$) در مقایسه با گروه کنترل و ** نشان دهنده تفاوت معنی دار ($p \leq 0.05$) در مقایسه با گروه مدل دیابتی است.

بحث و نتیجه‌گیری

فعالیت بدنی طیف وسیعی از مزایا را ارائه می‌دهد که برای کنترل بسیاری از بیماری‌ها مؤثر می‌باشد. با این وجود مکانیسم‌هایی که ورزش سبب بهبود بسیاری از مسیرهای مولکولی تخریب شده

در اثر بیماری می‌شود، به خوبی درک نشده است. از جمله این بیماری و آسیب‌ها تخریب اعصاب محیطی و درد نوروپاتی ناشی از دیابت می‌باشد. در این مطالعه مشاهده شد که ۸ هفته تمرین هوازی همراه با مکمل دهی نانوآوژنول مؤثرتر از تأثیر هر یک از این عوامل بر بهبود

التهاب و بافت شناسی ناحیه گانگلیون ریشه پشتی رت‌های دیابتی دارد.

نتایج مطالعه حاضر بیان کننده تخریبات بافتی و به هم‌ریختگی انسجام سلول‌های گانگالیونی همراه با افزایش ژن‌های TNF- α و IL-1B در ناحیه گانگالیونی به دنبال القای دیابت با STZ در نمونه حیوانی بود، همسو با نتایج مطالعه حاضر بیان شده که سیتوکین‌های بیشماری نظیر اینترلوکین ۱ (IL-1 α , IL-1 β), اینترلوکین ۲ (IL-2), اینترلوکین ۴ (IL-4), اینترلوکین ۶ (IL-6), اینترلوکین ۱۰ (IL-10), اینترفرون گاما (IFN- γ), با تبدیل فاکتور رشد بتا (TGF- β), TNF- α) در شرایط درد نوروپاتی در نخاع و DRG فعال می‌شود (۳۹-۴۱). سیتوکین‌های ضدالتهابی در طیف گسترده‌ای از تحقیقات در شرایط درد اعصاب و التهاب دخیل بوده‌اند (۴۲). برجسته‌ترین نشانگر التهاب، TNF- α مورد بررسی قرار گرفته است که نقش کلیدی در مکانیسم‌های محیطی و مرکزی حساسیت به محرک‌های دردناک دارد (۴۳). لذا افزایش فاکتورهای التهابی TNF- α و IL-1B در گروه دیابتی پژوهش حاضر دور از انتظار نیست و نشان دهنده تخریبات التهابی ناشی از دیابت در ناحیه DRG می‌باشد. همچنین تغییرات افزایشی این فاکتورهای التهابی را می‌توان به ارتباط سیستم عصبی با ایمنی نسبت داد. بیان شده که سیستم ایمنی و عصبی از طریق سلول‌های ایمنی، در حالت‌های درد مزمن به‌طور قابل توجهی تعامل دارند. بسیاری از این تعامل‌ها شامل سنتز و آزاد سازی واسطه‌های التهابی و انتقال دهنده‌های عصبی است (۴۴). در صورت آسیب دیدگی، بافت آسیب دیده دفع سلول‌های ماست سل و انتشار سیتوکین پیش التهابی مانند فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF- α) و اینترلوکین ۱ بتا (IL-1 β) را نشان می‌دهد (۴۵، ۴۶). به دلیل حضور مکرر این فاکتورها در هنگام محرک‌های دردناک، سیتوکین‌های التهابی به‌عنوان یک هدف معقول برای توضیح کاهش میزان تخریب DRG و علائم درد مشاهده شده در مدل‌های نوروپاتی انتخاب می‌شوند. در این مطالعه نشان داده شد که پروتکل تمرین ورزشی انجام شده و مصرف مکمل به‌تنهایی عامل التهابی TNF- α را کاهش می‌دهند؛ اما مصرف مکمل نانوآوژنول همراه با تمرین ورزشی قادر به کنترل بهتر این عامل در موش‌های دیابتی شده بود. این در حالی بود که مدالیته‌های درمانی پژوهش حاضر قادر به کنترل معنی دار در IL-B نبودند. از مزایای برجسته برنامه‌های ورزش استقامتی و مقاومتی، کاهش سیتوکین‌های ضدالتهابی و افزایش نشانگرهای ضدالتهابی است (۴۷). تمرینات ورزشی حاد و مزمن تأثیرات متفاوتی بر پاسخ‌های ایمنی دارند. همسو با نتایج مطالعه حاضر مشخص شده است که ورزش منظم باعث کاهش نشانگرهای التهابی در افراد جوان و مسن می‌شود (۴۸، ۴۹). در حین و بعد از ورزش، ماهیچه‌های اسکلتی سطح IL-6 را

افزایش می‌دهد، که به نظر می‌رسد این افزایش مسئول افزایش سطح سایتوکاین‌های ضدالتهابی مانند IL-10 و آگونیست گیرنده IL-1RA باشد (۵۰). IL-6 به‌عنوان یک میوکین، سیتوکین توصیف شده است که در حین انقباض در حالی که تأثیرات آن را روی اعضای دیگر می‌گذارد، از فیبرهای عضلانی رها می‌شود (۵۱). نشان داده شده که IL-6 هنگامی که به‌عنوان تزریق داخل وریدی تجویز می‌شود، اثرات ضدالتهابی مشابه با یک دوره ورزش، بر مهار سیتوکین‌های پیش التهابی مانند TNF- α دارد (۵۲). با این وجود در مطالعه حاضر تغییرات IL-6 در ناحیه DRG بررسی نشد اما به نظر می‌رسد افزایش سایتوکاین‌های ضدالتهابی ناشی از ورزش در کنترل فاکتورهای پیش التهابی پژوهش حاضر تأثیر گذار بوده باشند که نیاز به بررسی دقیق‌تر دارد. همسو با نتایج مطالعه حاضر همچنین نشان داده شده که دودیدن روی تردمیل سطح ماده P، IL-6، TNF- α ، NR1 و IL-1 β سطح P را کاهش می‌دهد (۵۳). همچنین ورزش شنا و تردمیل باعث فاکتورهای TNF- α و IL-1 β می‌شود (۵۴). با این وجود تاکنون مطالعه‌ای به بررسی استفاده از مکمل آوژنول به‌صورت نانو همراه با تمرین ورزشی بر شاخص‌های التهابی در ناحیه DRG نپرداخته است. نشان داده شده که مکمل آوژنول شامل خاصیت آنتی‌اکسیدانتی بالایی بوده و استفاده از آن برای دردهای عصبی نیز پیشنهاد شده است. بیان شده که افزایش مصرف این مکمل با بالا بردن ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی در مقابل تخریبات اکسایشی ناشی از دردهای عصبی مقابله می‌کند. به نظر می‌رسد ترکیب تمرین ورزشی پژوهش حاضر با مکمل نانو نیز تأثیرات آنتی‌اکسیدانتی دوجندانی را القا کنند که تخریبات فاکتورهای التهابی را به حداقل می‌رسانند.

این مشاهده با نتایج بافت شناسی ناحیه DRG نیز هم‌خوانی دارد. دیابت منجر به کاهش سلول‌های گانگلیونی در این ناحیه شد در حالیکه تمرین ورزشی ۸ هفته‌ای انجام شده در این مطالعه میزان این سلول‌ها را افزایش داد. همین نتیجه در مورد مصرت نانوآوژنول به‌تنهایی نیز مشاهده شد. اما یک برنامه ترکیبی مصرف همزمان مکمل نانوآوژنول و انجام تمرین ورزشی بر کاهش تخریبات بافتی ۲۰۲۰/۰۹/۰۴ ناشی از دیابت بیشتر مؤثر بوده است و تعداد اسن سلول‌ها را به سطح سلول‌های گانگلیونی این ناحیه در موش‌های سالم رسانده است. لذا اهمیت درمان ترکیبی به وضوح در این مطالعه مشاهده شد.

در نهایت می‌توان بیان کرد که استفاده از مکمل نانوآوژنول در کنار تمرین ورزشی به‌ویژه از نوع استقامتی (به‌صورت منظم) در کنترل تخریبات عصبی دیابت با تنظیم منفی فاکتور التهابی TNF- α به‌ویژه در ناحیه DRG مؤثر باشد. افزایش موش‌های هر گروه، انجام تمرینات ورزشی با برنامه متفاوت و بررسی سایر فاکتورهای

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از کمک‌های دانشگاه آزاد اسلامی در تمام مراحل انجام این پروژه تقدیر و تشکر می‌گردد.

التهابی می‌تواند در مطالعات آینده مورد بررسی قرار بگیرد. همچنین بررسی تغییرات IL-1B با تمرین ورزشی و مکمل نانواوژنول نیاز به مطالعات بیشتر دارد.

References

- Alkhatib A, Tuomilehto J. Lifestyle diabetes prevention. in Encyclopedia of Endocrine Diseases. Elsevier; 2019. p. 148-59.
- Mekala KC, Bertoni AG. Epidemiology of diabetes mellitus, in Transplantation, Bioengineering, and Regeneration of the Endocrine Pancreas. Elsevier; 2020. p. 49-58.
- Hoogendoorn CJ, Shapira A, Roy JF, Kane NS, Gonzalez JS. Diabetes Distress and Quality of Life in Adults with Diabetes, in Behavioral Diabetes. Springer; 2020. p. 303-28.
- Pop-Busui R, Boulton AJ, Feldman EL, Bril V, Freeman R, Malik RA, et al. Diabetic neuropathy: a position statement by the American Diabetes Association. Diabetes care 2017; 40(1): 136-54.
- Asmat U, Abad K, Ismail K. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. Saudi Pharmaceutical Journal 2016; 24(5): 547-53.
- Greene DA, Sima AA, Stevens MJ, Feldman EL, Lattimer SA. Complications: neuropathy, pathogenetic considerations. Diabetes care 1992;15(12): 1902-25.
- Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced products of nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic vascular disease. Diabetes Metab Rev 1988; 4(5): 437-51.
- Dyck PJ. Hypoxic neuropathy Does hypoxia play a role in diabetic neuropathy?: The 1988 Robert Wartenberg Lecture. Neurology 1989; 39(1): 111.
- Cameron NE, Cotter MA. Effects of evening primrose oil treatment on sciatic nerve blood flow and endoneurial oxygen tension in streptozotocin-diabetic rats. Acta Diabetol 1994; 31(4): 220-5.
- Cameron NE, Cotter MA, Jack AM, Basso MD, Hohman TC. Protein kinase C effects on nerve function, perfusion, Na⁺, K⁺-ATPase activity and glutathione content in diabetic rats. Diabetologia 1999; 42(9): 1120-30.
- Hellweg R, Hartung HD. Hartung, Endogenous levels of nerve growth factor (NGF) are altered in experimental diabetes mellitus: a possible role for NGF in the pathogenesis of diabetic neuropathy. Journal of neuroscience research 1990; 26(2): 258-67.
- Pop-Busui R, Ang L, Holmes C, Gallagher K, Feldman EL. Inflammation as a therapeutic target for diabetic neuropathies. Curr Diab Rep 2016; 16(3): 29.
- Nickander KK, Schmelzer JD, Rohwer DA, Low PA. Effect of α -tocopherol deficiency on indices of oxidative stress in normal and diabetic peripheral nerve. J Neurol Sci 1994; 126(1): 6-14.
- Luo X, Tai WL, Sun L, Pan Z, Xia Z, Chung SK, et al. Crosstalk between astrocytic CXCL12 and microglial CXCR4 contributes to the development of neuropathic pain. Mol Pain 2016; 12: 1744806916636385.
- Clark AK, Old EA, Malcangio M. Neuropathic pain and cytokines: current perspectives. Journal of pain research 2013; 6: 803.
- Yeh JF, Akinci A, Al Shaker M, Chang MH, Danilov A, Guillen R, et al. Monoclonal antibodies for chronic pain: A practical review of mechanisms and clinical applications. Mol Pain 2017; 13: 1744806917740233.
- Campbell JN, Meyer RA. Mechanisms of neuropathic pain. Neuron 2006; 52(1): 77-92.

18. Zhu D, Fan T, Huo X, Cui J, Cheung CW, Xia Z. Progressive increase of inflammatory CXCR4 and TNF-Alpha in the dorsal root ganglia and spinal cord maintains peripheral and central sensitization to diabetic neuropathic pain in rats. *Mediators Inflamm* 2019; 2019: 4856156.
19. Chatzigeorgiou A, Harokopos V, Mylona-Karagianni C, Tsouvalas E, Aidinis V, Kamper E. The pattern of inflammatory/anti-inflammatory cytokines and chemokines in type 1 diabetic patients over time. *Ann Med* 2010; 42(6): 426-38.
20. Koneri RB, Samaddar S, Simi SM, Rao ST. Neuroprotective effect of a triterpenoid saponin isolated from *Momordica cymbalaria* Fenzl in diabetic peripheral neuropathy. *Indian J Pharmacol* 2014; 46(1): 76.
21. Nam H, Kim MM. Eugenol with antioxidant activity inhibits MMP-9 related to metastasis in human fibrosarcoma cells. *Food Chem Toxicol* 2013; 55: 106-12.
22. Jirovetz L, Buchbauer G, Stoilova I, Stoyanova A, Krastanov A, Schmidt E. Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. *J Agric Food Chem* 2006; 54(17): 6303-7.
23. Kabuto H, Tada M, Kohno M. Eugenol (2-methoxy-4-(2-propenyl) phenol) prevents 6-hydroxydopamine-induced dopamine depression and lipid peroxidation inductivity in mouse striatum. *Biol Pharm Bull* 2007; 30(3): 423-7.
24. Nuchuchua O, Saesoo S, Sramala I, Puttipipatkachorn S, Soottitantawat A, Ruktanonchai U. Physicochemical investigation and molecular modeling of cyclodextrin complexation mechanism with eugenol. *Food Res Int* 2009; 42(8): 1178-85.
25. Liang WZ, Chou CT, Hsu SS, Liao WC, Shieh P, Kuo DH, et al. The involvement of mitochondrial apoptotic pathway in eugenol-induced cell death in human glioblastoma cells. *Toxicol Lett* 2015; 232(1): 122-32.
26. Karthikesan K, Pari L, Menon VP. Protective effect of tetrahydrocurcumin and chlorogenic acid against streptozotocin-nicotinamide generated oxidative stress induced diabetes. *J Funct Foods* 2010; 2(2): 134-42.
27. Abd-Elsalam KA, Khokhlov AR. Eugenol oil nanoemulsion: antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and phytotoxicity on cottonseeds. *Appl Nanosci* 2015; 5(2): 255-65.
28. Esmaeili F, Rajabnejhad S, Partoazar AR, Mehr SE, Faridi-Majidi R, Sahebgharani M, et al. Anti-inflammatory effects of eugenol nanoemulsion as a topical delivery system. *Pharm Dev Technol* 2016; 21(7): 887-93.
29. Sobhani V, Mirdar S, Arabzadeh E, Hamidian G, Mohammadi F. High-intensity interval training-induced inflammation and airway narrowing of the lung parenchyma in male maturing rats. *Comp Clin Path* 2018; 27(3): 577-82.
30. Woods JA, Vieira VJ, Keylock KT. Exercise, inflammation, and innate immunity. *Immunol Allergy Clin North Am* 2009; 29(2): 381-93.
31. Almeida C, DeMaman A, Kusuda R, Cadetti F, Ravanelli MI, Queiroz AL, et al. Exercise therapy normalizes BDNF upregulation and glial hyperactivity in a mouse model of neuropathic pain. *Pain* 2015; 156(3): 504-13.
32. Dobson JL, McMillan J, Li L. Benefits of exercise intervention in reducing neuropathic pain. *Front Cell Neurosci* 2014; 8: 102.
33. Singh PK, Baxi DB, Mukherjee R, Selvaraj J, Ramachandran AV. Diabetic amelioration by poly herbal supplement and exercise: studies on Type-I diabetic rat model. *J Herb Med Toxicol* 2010; 4(1): 217-26.
34. Baxi DB, Ramachandran AV, Singh PK, Mukherjee R. Evaluation on the efficacy of a Poly herbal supplement along with exercise in alleviating Dyslipidemia, Oxidative stress and hepatic and renal toxicity associated with Type-1 diabetes. 2010.

35. Arabzadeh E, Samadian Z, Tofighi A, Azar JT. Alteration of follistatin-like 1, neuron-derived neurotrophic factor, and vascular endothelial growth factor in diabetic cardiac muscle after moderate-intensity aerobic exercise with insulin. *Sport Sci Health* 2020; 1-9.
36. Furman BL. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Current protocols in pharmacology* 2015; 70(1): 5-47.
37. Srinivasan S, Sathish G, Jayanthi M, Muthukumaran J, Muruganathan U, Ramachandran V. Ameliorating effect of eugenol on hyperglycemia by attenuating the key enzymes of glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 2014; 385(1-2): 159-68.
38. Zhang J, Xiong H. Brain tissue preparation, sectioning, and staining, in *Current Laboratory Methods in Neuroscience Research*. Springer; 2014. p. 3-30.
39. Hopkins SJ, Rothwell NJ. Cytokines and the nervous system I: expression and recognition. *Trends in neurosciences* 1995; 18(2): 83-8.
40. Ledebøer A, Jekich BM, Sloane EM, Mahoney JH, Langer SJ, Milligan ED, et al. Intrathecal interleukin-10 gene therapy attenuates paclitaxel-induced mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in dorsal root ganglia in rats. *Brain Behav Immun* 2007; 21(5): 686-98.
41. Mika J, Korostynski M, Kaminska D, Wawrzczak-Bargiela A, Osikowicz M, Makuch W, et al. Interleukin-1 α has antiallodynic and antihyperalgesic activities in a rat neuropathic pain model. *Pain* 2008; 138(3): 587-97.
42. Mika J, Zychowska M, Popiolek-Barczyk K, Rojewska E, Przewlocka B. Importance of glial activation in neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 2013; 716(1-3): 106-19.
43. Leung L, Cahill CM. TNF- α and neuropathic pain-a review. *Journal of neuroinflammation* 2010; 7(1): 27.
44. Ren K, Dubner R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. *Nat Med* 2010; 16(11): 1267.
45. Rittner HL, Brack A, Stein C. Pain and the immune system. *Br J Anaesth* 2008; 101(1): 40-4.
46. Xu ZZ, Zhang L, Liu T, Park JY, Berta T, Yang R, et al. Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. *Nat Med* 2010; 16(5): 592.
47. Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat Rev Immunol* 2011; 11(9): 607-15.
48. Mattusch F, Dufaux B, Heine O, Mertens I, Rost R. Reduction of the plasma concentration of C-reactive protein following nine months of endurance training. *Int J Sports Med* 2000; 21(01): 21-4.
49. Prescott JF, Nicholson VM. The effects of combinations of selected antibiotics on the growth of *Corynebacterium equi*. *J Vet Pharmacol Ther* 1984; 7(1): 61-4.
50. Pedersen BK, Edward F. Adolph distinguished lecture: muscle as an endocrine organ: IL-6 and other myokines. *J Appl Physiol* 2009; 107(4): 1006-14.
51. Petersen AM, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* 2005; 98(4): 1154-62.
52. Starkie R, Ostrowski SR, Jauffred S, Febbraio M, Pedersen BK. Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF- α production in humans. *FASEB J* 2003; 17(8): 884-6.
53. Chen YW, Hsieh PL, Chen YC, Hung CH, Cheng JT. Physical exercise induces excess hsp72 expression and delays the development of hyperalgesia and allodynia in painful diabetic neuropathy rats. *Anesth Analg* 2013; 116(2): 482-90.

54. Chen YW, Li YT, Chen YC, Li ZY, Hung CH. Exercise training attenuates neuropathic pain and cytokine expression after chronic constriction injury of rat sciatic nerve. *Anesth Analg* 2012; 114(6): 1330-7.

THE EFFECT OF 8 WEEKS OF AEROBIC EXERCISE WITH NANO EUGENOL SUPPLEMENTATION ON INFLAMMATORY FACTORS OF TNF-A AND IL-1B AND HISTOLOGICAL CHANGES OF DORSAL ROOT GANGLION IN DIABETIC RATS

Abbas Shareghi boroujeni ¹, khosro Jalali Dehkordi ^{*2}, Gholamreza sharifi ³,
Farzaneh Taghian ⁴, Zohreh Mazaheri ⁵

Received: 19 February, 2020; Accepted: 19 June, 2020

Abstract

Background & Aims: The aim of this study was to investigate the effect of 8 weeks of aerobic exercise with Nano eugenol supplementation on inflammatory factors of TNF-a and IL-1B and histological changes of dorsal root ganglion in diabetic rats.

Materials & Methods: 25 Wistar 8-week-old male rats were divided into 5 groups: Normal control group, Diabetic control group (Model), Diabetic + exercise group (Model + Exe), Diabetic group + Nano vaginal (Model + Nano), and Diabetic + exercise training + nano eugenol (Model + Exe + Nano). The diabetes model was induced by peritoneal injection of streptozotocin to the respective groups. The eugenol supplement was also gavaged to the supplement groups. Exercise groups also exercised for 8 weeks, 5 days a week (30 m / min).

Results: Induction of diabetes using STZ led to destruction of the tissue and cell alignment in the DRG region. Gene changes also showed that TNF-a and IL-1B inflammatory factors showed a significant increase in the DRG region in the diabetic group compared to the control group ($p = 0.001$ for both variables). The study of therapeutic modalities also showed that only the diabetic + exercise + nanougenol group showed a significant decrease in TNF-a compared to the diabetic group ($p = 0.001$).

Conclusion: According to the results of the present study, it seems that the use of nanougenol supplementation along with exercise training may be effective in controlling the neurological damage of diabetes by negatively regulating the inflammatory factor TNF-a, especially in the DRG region.

Keywords: Aerobic Exercise, Nano eugenol, TNF-a, IL-1B, Diabetes

Address: Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

Tel: +989131854997

Email: khosrojalali@gmail.com

SOURCE: STUD MED SCI 2020: 31(5): 409 ISSN: 2717-008X

¹ PhD student, Department of Sport Physiology, School of Sport Sciences, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

² Assistant Professor, Department of Sport Physiology, School of Sport Sciences, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran (Corresponding Author)

³ Associate Professor, Department of Sport Physiology, School of Sport Sciences, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Sport Physiology, School of Sport Sciences, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

⁵ Histogenic Laboratory, Tehran, Iran