Archive of SID

فصلنامه علمی پژوهشی میکروبیولوژی کاربردی در صنایع غذایی دوره ۲، شماره ۱، بهار ۱۳۹۵، صفحات ۵۱ تا ۶۲

بررسی تاثیر *لاکتوباسیلوس کازئی* TD_2، پروبیوتیک بومی ایران بر میزان ترشح هورمون‌های تیروئیدی (T_3 و T_4) در رت نر نژاد ویستار تحت شرایط استرس بی حرکتی مزمن

مهناز فرجی[1]، حمیدرضا مهاجرانی[2]، پروانه جعفری[3]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات اراک، اراک، ایران
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات اراک، اراک، ایران
۳. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات اراک، اراک، ایران (نویسنده مسئول)*

تاریخ دریافت:۱۳۹٤/۰۸/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۲/۰۱

چکیده

غده تیروئید که بلافاصله در زیر حنجره در دو طرف و جلوی نای واقع شده،یکی از بزرگترین غدد درون‌ریز بوده و به طور طبیعی ۱۵ تا ۲۰gr در افراد بالغ وزن دارد. تیروئید دو هورمون قابل ملاحظه یعنی تیروکسین و تری‌یدوتیرونین که معمولا به ترتیب T_3 و T_4 نامیده می‌شوند را ترشح می‌کند. تمامی شرایط استرس‌زا از جمله استرس‌های فیزیکی و شیمیایی سبب افزایش در T_3 و T_4 و کاهش در TSH می‌شوند. استرس غلظت کوتیزول را افزایش داده و باعث کاهش غلظت T_3 و T_4 می‌شود. پروبیوتیک‌ها دسته‌ای از میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در صورت مصرف به میزان مشخص اثرات مفیدی برروی سلامت میزبان می‌گذارند. تغذیه با پروبیوتیک‌ها می‌تواندغلظت کورتیزول را کاهش داده بنابراین باعث افزایش غلظت T_4 وT_3 می‌گردد زیرا غلظت‌های بالای هورمون‌های آدرنال کورتیکال مسئول کم‌کاری تیروئید می‌باشد. برای انجام این تحقیق۴۰ رت نر نژاد ویستار با سن و وزن تقریبی یکسان ۱۳۰-۱۱۰gr انتخاب شد. پس از ۲ هفته دوره سازگاری، رت‌ها به طور تصادفی در چهار گروه ده‌تایی شامل ۲ گروه کنترل و۲ گروه آزمون دسته‌بندی شدند. گروه کنترل منفی به مدت ۲۱ روز با ۱ ml بافر فسفات با pH خنثی گاواژ شدند. گروه کنترل مثبت علاوه بر گاواژ روزانه با بافر، هر روز به مدت ۱۵ min برای ایجاد استرس بی‌حرکتی مزمن در دستگاه نگهدارنده قرارداده شدند. گاواژ روزانه گروه آزمون ۱ با پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* TD_2، صورت گرفت در حالی که گروه آزمون ۲ علاوه بر پروبیوتیک، استرس نیر دریافت می‌نمود. پس از طی شدن دوره آزمون، رت‌ها با اتر بیهوش و سپس خون‌گیری از قلب آن‌ها انجام شد. با جدا کردن سرم خون، میزان هورمون‌های تیروئیدی (T_3 و T_4) موجود در خون آن‌ها با استفاده از کیت اندازه‌گیری شد. نتایج حاصله از این آزمون و مقایسه ۲ گروه کنترل منفی و مثبت نشان که در طی استرس میزان هورمون T_4 از ۱/۴۱۷±۰/۰۵۴۸۶ mg/dl به ۱/۲۳۰±۰/۰۴۰۱۶ mg/dl به صورت معنی داری کاهش یافت (P=۰/۰۱۴۶). همچنین مشخص گردید که دریافت پروبیوتیک در گروه آزمون ۲، سبب افزایش معنی‌دار غلظت هورمون تا ۱/۳۳۱±۰/۰۱۹۹۰ mg/dl نسبت به گروه کنترل مثبت می‌گردد (P=۰/۰۳۳۸). میزان ترشح هورمون در این گروه از گروه کنترل منفی که استرسی دریافت نکرده به صورت معنی‌داری بالاتر نبود (P=۰/۱۴۳۵). این امر نشان دهنده این می‌باشد که هنگام استرس مصرف پروبیوتیک سبب افزایش میزان ترشح هورمون T_4 شده و

* p-jafari@iau-arak.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

میزان غلظت هورمون به سطح عادی خود باز می‌گردد. مقایسه دو گروه کنترل ۱ و کنترل ۲ نشان داد که در طی استرس اختلاف معنی داری بین این دو گروه در میزان هورمون T_3 وجود ندارد(P=۰/۱۵۳۹) که بدین معنی می‌باشد که استرس تغییری در میزان هورمون T_3 در رت‌ها نداشت . مقایسه ۲ گروه کنترل منفی و مثبت نشان که در طی استرس میزان هورمون T_3 از ۱/۳۴۴ ±۰/۰۵۳۹۳ mg/dl به ۱/۴۰۲±۰/۰۵۵۸۹ mg/dl دارای اختلاف معنی‌داری نبوده (P=۰/۴۵۹۶) که نشان دهنده این امر می‌باشد که در صورت عدم وجود استرس، پروبیوتیک‌ها تغییری در ترشح میزان این هورمون نخواهند داشت. نتایج این آزمون نشان می‌دهد که مصرف *لاکتوباسیلوس کازئی*[۱] به عنوان پروبیوتیک می‌تواند در صورت وجود استرس‌های مزمن، از اثرات منفی آن‌ها بر کاهش میزان هورمون تیروئیدی T_4 ممانعت به عمل آورده وسبب افزایش میزان ترشح هورمون شده و میزان غلظت آن را به سطح عادی خود باز می‌گرداند. استرس تاثیری بر میزان هورمون T_3 در رت‌ها نداشت در نتیجه مصرف *لاکتوباسیلوس کازئی* سبب تغییری در میزان هورمون نگردید.

کلمات کلیدی: استرس، پروبیوتیک، T_4، T_3 ، هورمون‌های تیروئیدی، *لاکتوباسیلوس کازئی*

[۱] *Lactobacillus casei*

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

امروزه عوامل استرس‌زای زیادی در زندگی انسان‌ها نقش بازی می‌کنند. استرس موجب تاثیرات منفی متعددی در بدن شده که از آن جمله می‌توان به تغییر در میزان ترشح بعضی از هورمون‌های کلیدی اشاره کرد. هورمون‌های تیروئیدی T_4[1]، T_3[2] و کورتیزول از جمله آن‌ها می‌باشند. T_3 و T_4 توسط غده تیروئید ترشح می‌گردندند که بلافاصله در زیر حنجره در دو طرف و جلوی نای واقع شده، یکی از بزرگترین غدد درون ریز بوده و به طور طبیعی ۱۵ تا ۲۰gr در افراد بالغ وزن دارد. ترشح تیروئید به طور عمده به‌وسیله هورمون محرک تیروئید[3] (TSH) تحریک شده و توسط غده هیپوفیز قدامی کنترل می‌شود. استرس‌های فیزیکی و شیمیایی سبب افزایش در T_3 و T_4 می‌شوند. این هورمون‌ها کنترل کننده میزان متابولیسم بدن بوده و فقدان کامل آن‌ها، موجب می‌شودکه میزان متابولیسم پایه حدود ۴۰ تا ٪۵۰ به کمتر از سطح طبیعی کاهش یابد. ترشح بیش از حد تیروئید می‌تواند میزان متابولیسم پایه را تا ۶۰ تا ۱۰۰٪ بالاتر از حد طبیعی افزایش دهد. هورمون تیروئید تقریباً کلیه جنبه‌های متابولیسم کربوهیدرات‌ها شامل جذب سریع گلوکز توسط سلول‌ها، تشدید گلیکولیز، تشدید گلوکونئوژنز و حتی افزایش ترشح انسولین با اثر ثانوی حاصل از آن روی متابولیسم کربوهیدرات را تحریک می‌کند.کلیه این اثرات احتمالاً ناشی از افزایش کلی در آنزیم‌های متابولیک سلولی در نتیجه‌ی هورمون تیروئید هستند. واکنش‌های هیجانی و عوامل استرس‌زای مختلف نیز می‌توانند بر برون‌ده TSH وTRH[4] تاثیر کرده و به طور غیر مستقیم بر ترشح هورمون‌های تیروئید موثر باشند (۱). هیجانات و اضطراب یعنی حالاتی که سیستم عصبی سمپاتیک را شدیدا تحریک می‌کنند موجب کاهش حادی در ترشح تیروتروپین می‌شوند.

پاسخ فیزیولوژی القا شده با استرس، با تاثیر بر سیستم عصبی مرکزی و سیستم عصبی خودمختار، باعث فعال‌سازی تغییراتی در سیستم اندوکرین بدن می‌گردد (۲). تمامی شرایط استرس‌زا از جمله استرس‌های فیزیکی و شیمیایی سبب افزایش در T_3 و T_4 و کاهش در TSH می‌شوند (۱). به عبارت دیگر محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال، محور سمپاتیک-آدرنال-نخاعی و محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-تیروئید به‌وسیله استرس‌زاها فعال شده و سبب پاسخ‌های هورمونی استرسی می‌گردد (۳). استرس مزمن با سرکوب عملکرد محور تیروئید مرتبط می‌باشد که سبب سرکوب ترشح TSH و کاهش تبدیل T_4 غیرفعال بهT_3 فعال‌تر به لحاظ بیولوژیکی می‌گردد (۴).

افزایش ترشح کورتیزول سبب تغییر قابل پیش‌بینی در متابولیسم هورمون‌های تیروئیدی می‌گردد. این الگو به صورت کاهش تولید TSH و کند شدن پاسخ TSH به TRH، کاهش در T_3و افزایش درT_3r است (۶,۵). حتی تغییرات در سطوح سرمی کورتیزول در محدوده طبیعی می‌تواند سبب تغییرات عمده در هورمون‌های تیروئید گردد (۷).

القای ترشح بسیار زیاد کورتیزول به‌وسیله ACTH، سبب کاهش تبدیل T_4 به T_3 شده و تبدیل T_4 به T_3r را افزایش می‌دهد. در نتیجه TSH بر اثر کند شدن پاسخ TRH کاهش پیدا می‌کند (۸,۶). کمبود کورتیزول ممکن اثر مخالفی بروی مقادیر هورمون‌های تیروئید داشته باشد. بررسی بیمارانی با کمبود ACTH مزمن یا سطوح کوتیزول کم نشان می‌دهد مقادیر هورمون‌های تیروئید در طول مدت کمبود کورتیزول تحت تاثیر قرار می‌گیرند به صورتی که T_4 کاهش پیدا کرده، T_3 افزایش پیدا کرده و T_3r به صورت عمده‌ای کاهش پیدا می‌کند. در نتیجه در زمان کمبود کورتیزول تبدیل T_4 به T_3 افزایش می‌یابد (۹). برای مثال افرادی که در معرض استرس

[1] 3,5,3,5-ltetraiodothyronine
[2] 3,5,3-l-triiodothyronine
[3] Thyroid-stimulating hormone
[4] Thyrotropin-releasing hormone

www.SID.ir

Archive of SID

سرمایی قرار گرفته باشند میزان T_3r سرمی آن‌ها افزایش پیدا می‌کند (۱). استرس مزمن باعث کاهش غلظت T_3 و T_4 می‌شود (۱۱,۴).

از عوارض کاهش هورمون‌های تیروئیدی می‌توان به هیپوتیروئیدیسم اشاره کرد که یک اختلالات اندوکرین نسبتاً شایع است. شیوع آن با افزایش سن بیشتر شده و اختلال در خانم‌ها ۱۰ برابر آقایان می‌باشد. افرادی با میزان TSH بالاتر از حد طبیعی، در معرض خطر این بیماری قرار دارند. میزان شیوع آن در حدود ۱٪ تا ۲٪ می‌باشد که میزان آن در خانم‌های مسن میزان آن به ۱۵٪ افزایش می‌یابد (۱۲).

برای درمان هیپوتیروئیدیسم معمولاً از تیروکسین سنتتیک ، لووتیرونین و لووتیروکسین مشتق سنتتیک T_3و T_4 و یا ترکیب T_3وT_4 استفاده می‌شود (۱۴,۱۳). اما هریک از این داروها عوارض جانبی و موارد منع مصرف دارند از جمله ایجاد هیپرتیروئیدیسم ناشی از درمان با تیروکسین سنتتیک (۱۳). در زنان، درمان طولانی مدت لووتیروکسین سدیم با افزایش بازجذب استخوان همراه است، در نتیجه کاهش تراکم معدنی استخوان به ویژه در زنان یائسه می‌گردد. همچنین برای مصرف لووکسین تیتراسیون دوز دقیقی لازم است تا از عوارض جانبی ان از جمله تاثیر روی رشد، عملکرد قلبی عروقی، متابولیسم استخوان، عملکرد باروری، عملکرد شناختی، عاطفی، عملکرد دستگاه گوارش و در متابولیسم گلوکز و چربی پیشگیری به عمل آید (۱۴). با توجه به عوارض جانبی داروهای سنتتیک ذکر شده، نیاز به داروهای ارگانیک با عوارض جانبی کمتری احساس می‌شود که از جمله این ترکیبات می‌توان به پروبیوتیک‌ها اشاره داشت.

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که اگر به مقدار کافی تجویز شوند اثرات مفیدی را بروی سلامت میزبان اعمال می‌کنند. آن‌ها برای درمان اختلالات رودی-معدی و سندرم‌های متابولیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۵). اکثر پروبیوتیک‌ها متعلق به گروه بزرگی از باکتری‌های اصلی فلور میکروبی روده انسان بوده و در آنجا زندگی همسفرگی بی‌ضرری دارند. باور موجود در مورد اثرات مفید پروبیوتیک‌ها، بر پایه این واقعیت قرار دارد که فلور میکروبی روده نقش محافظت کننده‌ای در برابر بیماری‌های مختلف از خود نشان می‌دهد. مشاهده شده است که مصرف دائم پروبیوتیک‌ها در کاهش میزان بروز بیماری‌های مختلف موثر است که این تاثیر در جمعیت‌های دارای خطر بالا مانند کودکان بستری در بیمارستان، کودکانی که شیر مادر مصرف نمی‌کنند یا در شرایط محروم به سر می‌برند، بارزتر است (۱۶). تغذیه با پروبیوتیک‌ها غلظت کورتیزول را کاهش داده که در نتیجه باعث افزایش غلظت T_4 و T_3 می‌گردند که ممکن است بتوانند به عنوان یک روش مناسب برای جلوگیری از کاهش هورمون‌های تیروئید در طی شرایط استرس مورد استفاده قرار گرفته و در نتیجه از ایجاد هیپوتیروئیدیسم و عوارض جانبی آن که در بالا ذکر شد جلوگیری به عمل آورد (۱۷).

مواد و روش‌ها

برای انجام این تحقیق ابتدا ۴۰ رت نر نژاد ویستار با سن و وزن تقریبی یکسان (وزن ۱۱۰-۱۳۰ gr و با سن ۴ هفته) از دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج)، مرکز علوم حیوانات آزمایشگاهی، خریداری و در قفس‌های استاندارد در دمای برابر ۲۵ °C±۲ نگهداری شدند. رت‌ها به مدت دو هفته سازگاری را در این شرایط طی کرده و در این مدت دسترسی آزاد به آب ومواد غذایی استاندارد داشتند. پس از طی شدن دوره سازگاری رت‌ها به صورت تصادفی به چهار گروه ده‌تایی به شرح زیر تقسیم شدند:

کنترل منفی: دریافت روزانه ۱ ml از بافر PBS با pH=۷/۲

www.SID.ir

Archive of SID

کنترل مثبت: دریافت روزانه ml ۱ از بافر PBS به همراه استرس روزانه

آزمون ۱: دریافت روزانه ml ۱ از بافر PBS حاوی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* سویه TD_2 با غلظت برابر 10^9 cfu/ml به صورت گاواژ درون معدی

آزمون ۲: دریافت روزانه ml ۱ از بافر PBS حاوی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* سویه TD_2 به همراه استرس روزانه بی حرکتی مزمن

لازم به ذکر است که رت‌ها در ابتدا و انتهای آزمون با استفاده از ترازو با دقت gr ۰/۰۱ توزین شدند تا میزان افزایش وزن‌ها در گروه‌های مختلف تعیین شود.

تهیه باکتری پروبیوتیک

لاکتوباسیلوس کازئی سویه TD_2 به صورت پودر لیوفیلیزه از شرکت تک ژن زیست[1] تهیه شد. در مرحله بعد باکتری در محیط کشت MRS Broth کشت و به مدت h ۴۸ در انکوباتور حاوی ۱۰٪ گاز دی‌اکسید کربن در دمای °C ۳۷ گرماگذاری شد. سپس به جهت تهیه استوک گلیسرول، هم حجم باکتری گلیسرول استریل به محیط مایع افزوده و پس از اختلاط کامل در فریزر °C۲۰- نگهداری شد.

برای تهیه کشت تازه از باکتری، روزانه ml ۲۰۰ از محیط کشت MRS Broth تهیه و به آن ml ۱/۵ از استوک باکتری افزوده و در شرایط قبل گرماگذاری صورت گرفت. پس از طی شدن دوره رشدی، با اسپکتوفتومتر میزان جذب نوری نمونه‌ها در nm ۶۰۰ تعیین شد. سپس با استفاده از روش کشت سطحی و تعیین سریال رقت، تعداد باکتری‌های موجود در هر ml ۱ از محیط کشت در جذب نوری معین تعیین گشت.

برای گاواژ کردن رت‌ها هر روز کشت تازه باکتری تهیه و تا رسیدن به جذب نوری تعیین شده از قبل، گرماگذاری شد.

[1] TakGene zist

سپس با استفاده از سانتریفوژ با دور rpm ۶۰۰۰ به مدت min۲۰ سلول‌های باکتری از فاز مایع جدا شدند. پس از ۳ بار شستشو با بافر PBS سلول‌ها مجدداً در همان بافر سوسپانسیون شدند تا غلظت 2×10^9 cfu/ml حاصل شود. از این سوسپانسیون برای گاواژ روزانه رت‌ها (دریافت خوراکی پروبیوتیک) بهره برده شد.

ایجاد استرس در رت‌ها

برای ایجاد استرس بی‌حرکتی مزمن[2]، رت‌ها روزانه در ساعت مشخص به مدت min ۱۵ در دستگاه نگهدارنده[3] قرار داده شدند. لازم به ذکر است که رت‌های گروه آزمون ۲ پس از دریافت پروبیوتیک در دستگاه نگهدارنده قرار داده می‌شدند.

خون‌گیری از رت‌ها و تعیین میزان هورمون‌های تیروئیدی (T_3 و T_4) و قند خون

پس از ۲۱ روز، رت‌های موجود در تمامی گروه‌ها با اتر بیهوش شده و بلافاصله خون‌گیری از قلب آن‌ها به عمل آمد. در حدود ml ۵ خون گرفته شده از هر رت در لوله سانتریفوژ کد گذاری شده ریخته شد. خون‌ها در rpm۵۰۰۰ در دمای °C۴- به مدت min ۱۰ سانتریفوژ شده و سرم آن‌ها جدا گردید.

سرم‌های جدا شده در فریزر با دمای °C۲۰- نگهداری و در اسرع وقت به جهت تعیین میزان هورمون‌ها و قند خون مورد بررسی قرار گرفتند. برای اندازه‌گیری هورمون‌های تیروئیدی از کیت Autobio و برای اندازه‌گیری میزان قند خون از کیت پارس آزمون[4] استفاده شد.

[2] Chronic Restraint Stress (CRS)
[3] Restrainer
[4] Pars azmoon

www.SID.ir

Archive of SID

اندازه‌گیری میزان هورمون‌های تیروئیدی با کیت Autobio

الف-آماده‌سازی

برای آماده سازی، کیت یک ساعت قبل از شروع سنجش در دمای اتاق قرار داده شد (۲۷-۲۰ °C) و کلیه آمپول‌ها (به ویژه استانداردها) به آرامی چندین بار هم‌زده شد تا اختلاط به خوبی صورت گیرد. سپس محلول شستشو تهیه شد. جهت آماده سازی محلول شستشو، محتویات یک آمپول با آب مقطر رقیق شد تا حجم کلی به ۱۰۰۰ ml رسید (نسبت ۱ به ۴۰) و به خوبی مخلوط‌شد. محتویات دو ویال کنترل، ۵ min قبل از مصرف با ۰/۱ ml محلول آب مقطر رقیق و خوب مخلوط شد. در مرحله بعد، آماده‌سازی کونژوگه صورت پذیرفت. برای این منظور به میزان ۱ حجم از کونژوگه غلیظ با ۲۰ حجم از محلول رقیق‌کننده کونژوگه مخلوط گردید.

ب- سنجش هورمون‌های تیروئیدی (T_3 و T_4)

برای سنجش میزان هورمون، ۵۰ µl از ویال استاندارد، سرم کنترل و نمونه‌ها به داخل هر چاهک اضافه شد. سپس ۱۰۰ µl از محلول کونژوگه آماده شده به هر چاهک افزوده گردید. پلیت به مدت ۳۰s به آرامی تکان داده شد تا مخلوط سرم و کونژوگه کاملاً همگن شود. سپس سطح چاهک‌ها با چسب پلیت پوشانده شد تا در حین گرماگذاری محتویات داخل چاهک‌ها تبخیر نگردد. پلیت‌ها به مدت ۶۰min در دمای ۳۷ °C گرماگذاری شدند. سپس محتویات داخل پلیت تخلیه شد و با ۳۵۰ µl -۳۰۰ از محلول شستشوی رقیق شده، ۵ بار شستشوی چاهک‌ها صورت گرفت.

در مرحله بعد ۱۰۰ µl از محلول سوبسترا به همه چاهک‌ها اضافه و پلیت به مدت ۲۰ min در دمای اتاق و در محیط تاریک گرماگذاری شد. در انتها ۵۰ µl از محلول متوقف کننده به چاهک‌ها افزوده و پلیت برای ۱۵-۲۰ s به آرامی روی سطح میز تکان داده شد تا واکنش متوقف گردد. جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۴۵۰ nm (یا ۶۵۰ nm) خوانده شد. لازم به ذکر است که جذب نوری حداکثر تا ۳۰min پس از افزودن متوقف کننده تعیین شد.

جدول (۱): میزان هورمونهای تیروئیدی، قند خون و افزایش وزن‌ها گروه‌های مختلف رت‌ها

گروه‌ها	هورمون T_3 (ng/dl)	هورمون T_4 (ng/dl)	افزایش وزن (gr)	گلوکز سرم (mg/dl)
کنترل منفی (بدون استرس)	۱/±۳۴۴/۰۵۳۹۳ [a]	۱/±۴۰۸/۰۴۹۷۸ [a]	۱۶۳/۰±۱/۸۱۷ [a]	۷۶/۷۵±۲/۰۵۶[a]
کنترل مثبت (با استرس)	۱/±۴۴۲/۰۳۸۵۸[a]	۱/±۱۲۹/۰۳۵۶۷ [b]	۱۲۸/۸±۱/۷۷۲ [b]	۸۸/۵۰±۱/۳۲۳[b]
آزمون ۱ (با پروبیوتیک)	۱/±۴۰۲/۰۵۵۸۹ [a]	۱/±۳۱۹/۰۶۷۸۸ [a]	۱۷۹/۹±۰/۷۴۸۳ [c]	۷۹/۰۱±۱/۰۸۰ [a]
آزمون ۲ (با استرس و پروبیوتیک)	۱/±۴۳۱/۰۲۷۰۱ [a]	۱/±۳۳۱/۰۱۹۹۰ [a]	۱۵۰/۳±۲/۵۴۲ [d]	۷۷/۷۵±۲/۳۹۴ [a]

www.SID.ir

Archive of SID

اندازه‌گیری میزان قند خون با کیت پارس آزمون

جهت تعیین میزان قند خون از سرم بدون همولیز یا پلاسمای هپارینه‌دار استفاده شد. برای انجام آزمون ابتدا ۵۰ µl از سرم درون یک لوله اپندورف[1] ریخته شد. در لوله‌ای دیگر ۵۰µl از محلول استاندارد ریخته و سپس به محتویات هر دو لوله ۲۰ µl معرف گلوکز افزوده شد. به جهت بلانک از لوله حاوی تنها معرف بهره برده شد. هر سه لوله به مدت ۱۰min در بن‌ماری ۳۷ °C یا ۲۰ min در دمای ۲۵ °C قرار داده شدند. سپس جذب نوری نمونه آزمون و استاندارد در مقابل بلانک در ۵۰۰ nm خوانده شد.

تفسیر داده‌ها

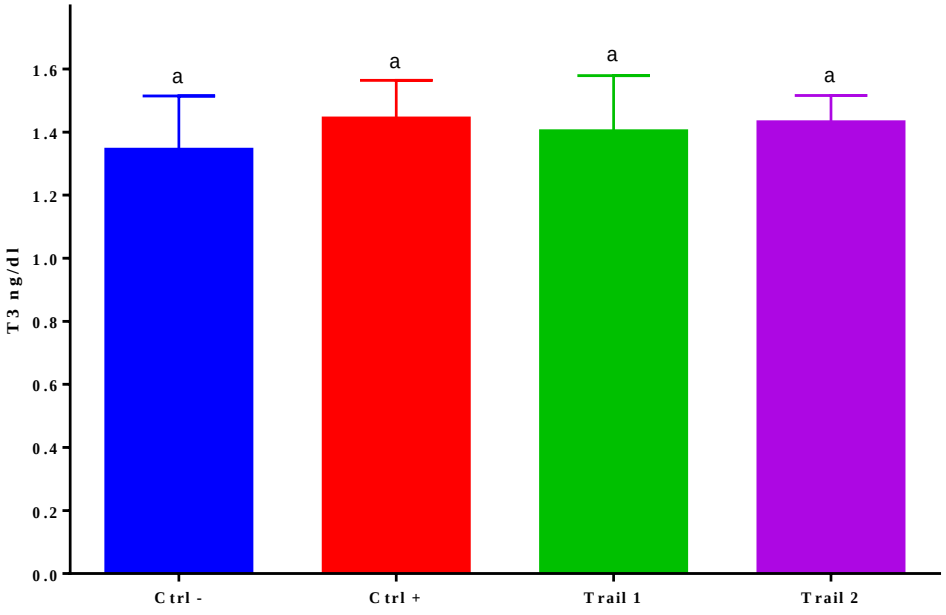
برای تفسیر داده‌ها و اطلاعات حاصله از نرم افزار Graphpad Prism 5 و آزمون‌های آماری t-test و Anova یک‌طرفه بهره برده شد.

نتایج

همان طور که ذکر شد در طی این تحقیق ۴۰ رت نر نژاد ویستار در ۴ گروه به صورت تصادفی تقسیم بندی شدند. پس از ۲۱ روز آزمون میزان هورمون‌های تیروئیدی، قند خون و میزان افزایش وزن رت‌ها تعیین شد که جدول زیر آورده شده است.

تغییرات سطح هورمون T_3

نتایج حاصل از این آزمون (نمودار ۱) نشان داد که استرس نمی‌تواند سبب تغییر معنی‌دار هورمون T_3 در گروه کنترل مثبت نسبت به گروه کنترل منفی شود (P=۰/۵۷۵). همچنین مصرف پروبیوتیک در گروه آزمون ۱ بدون استرس تاثیری بر میزان ترشح این هورمون نداشته به نحوی که مقدار این هورمون تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل منفی نداشت (P=۰/۹۳۶). در مقایسه بین گروه کنترل مثبت و آزمون ۲ مشخص گردید که اختلاف بین این دو گروه معنی‌دار نیست (P=۰/۹۹۹).



نمودار (۱): مقایسه تغییرات سطح هورمون T_3 در رت‌های گروه‌های مختلف

[1] Eppendorf

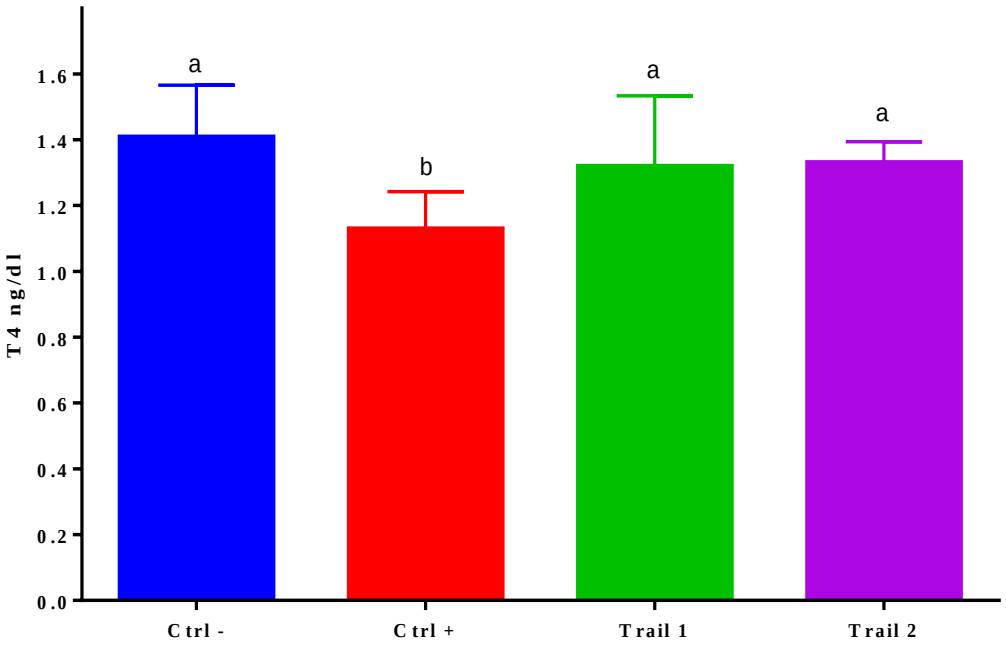
www.SID.ir

Archive of SID

تغییرات سطح هورمون T_4

نتایج حاصل از این آزمون (نمودار ۲) نشان داد که استرس بی حرکتی مزمن می‌توان به کاهش معنی‌داری میزان هورمون T_4 در گروه کنترل مثبت نسبت به گروه کنترل منفی منجر گردد (P=۰/۰۰۱).

با مصرف گروه کنترل منفی و آزمون ۱ می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً مصرف پروبیوتیک در شرایط بدون استرس، تغییر معنی داری را در میزان ترشح این هورمن سبب فاقد استرش تاثیری بر میزان قند خون نسبت به شرایط نمی گردد (P=۰/۷۰۸). در شرایط استرسی، پروبیوتیک مصرفی توانسته می‌تواند ازکاهش ترشح T_4 ممانعت نماید به نحوی که میزان ترشح این هورمون در گروه آزمون ۲ تفاوت معنی داری با گروه کنترل مثبت داشت (P=۰/۰۲۶). بررسی بیشتر نتایج نشان داد که در این گروه آزمون، میزان سطح هورمون به میزان طبیعی رسیده و تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل منفی نداشت (P=۰/۸۲۱).



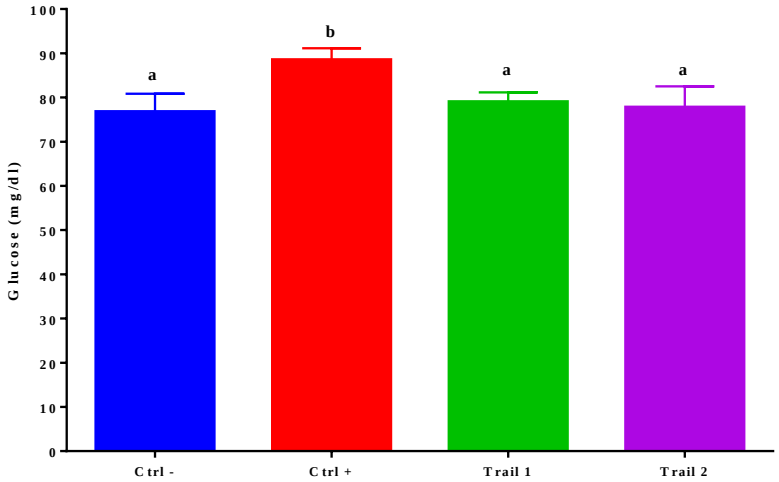
نمودار (۲): مقایسه تغییرات سطح هورمون T_4 در رت‌های گروه‌های مختلف

سطح گلوکز سرمی خون

همان طور که در نمودار (۳) دیده می‌شود استرس بی حرکتی مزمن سبب افزایش گلوکز سرمی در گروه کنترل مثبت نسبت به کنترل منفی گشته است (P=۰/۰۰۳۵). همان طور که انتظار می‌رفت مصرف پروبیوتیک نه تنها در شرایط کنترلی نداشته (P=۰/۹۱۹) بلکه سبب گشته که گروه استرس نیز قند خون به شرایط اولیه بر گردد. به عبارت دیگر تفاوتی در میزان قند خون در گروه استرسی دریافت کننده پروبیوتیک با گروه کنترل منفی وجود ندارد (P=۰/۹۹۰).

www.SID.ir

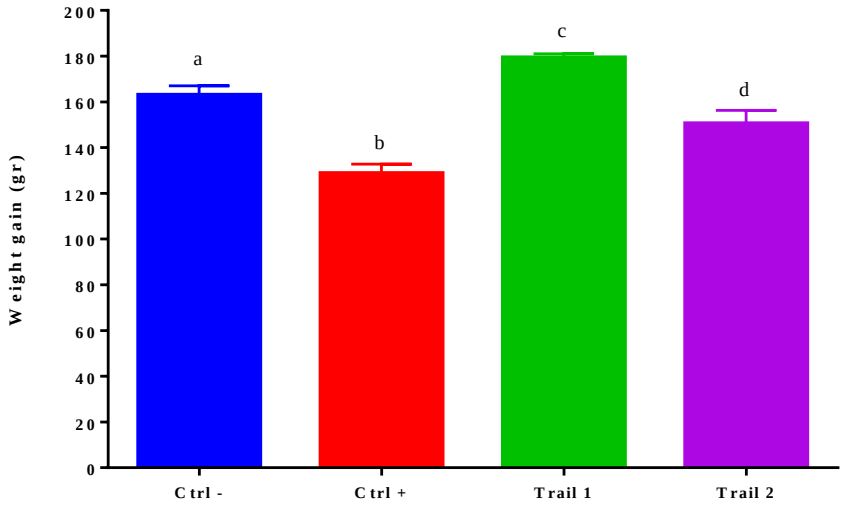
Archive of SID



نمودار (۳): سطوح گلوکز سرمی در رت‌های گروه‌های مختلف

افزایش وزن رت‌ها

نتایج حاصله نشان داد (نمودار ۴) که استرس و به همراه آن مشکلات متابولیم سبب کاهش معنی‌دار وزن رت‌ها در گروه کنترل مثبت نسبت به کنترل منفی می‌شود (P<۰/۰۰۰۱). تحقیقات نشان داده که پروبیوتیک‌ها می‌تواند با بهبود تغذیه، افزایش وزن در حیوانات را در پی داشته باشند. در این آزمون نیز دیده شد که مصرف پروبیوتیک می‌تواند افزایش وزن را در گروه آزمون ۱ نسبت به کنترل منفی سبب شود (P <۰/۰۰۰۱). حتی در شرایط استرس نیز مصرف این پروبیوتیک می‌تواند از کاهش وزن رت‌ها جلوگیری به عمل آورد (P <۰/۰۰۰۱). البته در این شرایط استرسی وزن گیری رت‌ها کمتر از گروه کنترلی می‌باشد که استرس ندیده‌اند (P <۰/۰۰۱۲).



نمودار (٤): مقایسه تغییرات افزایش وزن رت‌های گروه‌های مختلف

www.SID.ir

Archive of SID

بحث ونتیجه‌گیری

پاسخ فیزیولوژی القا شده با استرس سبب تاثیراتی بر روی سیستم عصبی مرکزی و سیستم عصبی خودمختار می‌گردد و در نتیجه روی HPA تاثیر گذارده و باعث فعال‌سازی تغییراتی در سیستم اندوکرین بدن می‌گردد (۲). تمامی شرایط استرس‌زا از جمله استرس‌های فیزیکی و شیمیایی سبب افزایش در T_3 و T_4 و کاهش در TSH می‌شوند (۲). محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال، محور سمپاتیک-آدرنال-نخاعی و محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-تیروئید به‌وسیله محرک فعال شده و سبب پاسخ‌های هورمونی استرسی می‌گردد.

بین محور تیروئید و عملکرد فوق کلیه میان‌کنش وجود دارد به این معنا که استرس با تغییرات هورمونی و عصبی شامل تغییرات در سطوح هورمون‌های تیروئید و فوق‌کلیه مرتبط می‌باشد. استرس مزمن با سرکوب عملکرد محور تیروئید مرتبط می‌باشد که سبب سرکوب ترشح TSH و کاهش تبدیل T_4 غیرفعال به T_3 فعال‌تر به لحاظ زیستی می‌گردد (۱۸,۳). فعالیت طبیعی محور HPA به‌وسیله ورودی تحریک روزانه استرس ناشی از تحریک و انواع حلقه بازخورد منفی تنظیم می‌گردد که به‌واسطه آزاد شدن هورمون کورتیکوتروپین هورمون آدرنوکورتیکوتروپین وتا حد زیادی توسط کورتیزول انجام می‌گردد (۱۹). با این حال، توانایی کورتیزول به تنظیم تولید خود آن ممکن است در طول استرس حاد و مزمن دچار اختلال شده و در نتیجه منجر به افزایش مستمر در سطح پلاسمایی آن گردد (۲۰). در نتیجه استرس غلظت کوتیزول را افزایش داده و باعث کاهش غلظت T_3 و T_4 می‌شود (۱۷).

تا کنون تحقیقات محدودی در زمینه اثر پروبیوتیک بر روی هورمون‌های تیروتیدی صورت گرفته است. ایجاز[1]، سوهایل[2] و همکارانش (۲۰۱۰) نشان دادند که پروبیوتیک‌ها می‌توانند غلظت کورتیزول را کاهش داده بنابراین باعث افزایش غلظت T_4 و T_3 می‌گردد.

نتایج حاصله از این تحقیق نیز نشان داد مصرف پروبیوتیک *لاکتو باسیلوس کازئی* سویه TD_2 تنها در صورت وجود استرس می‌تواند بر میزان ترشح هورمون تیروتیدی T_4 موثر باشد و هیچ گونه تاثیری بر میزان ترشح T_3 ندارد. این سویه با افزایش میزان هورمون T_4 در شرایط استرس و رساندن آن به حد طبیعی می‌تواند از اثرات سوء آن مانند هیپوتیروئیدیسم بکاهد.

همچنین مشاهده شد که این سویه می‌تواند از کاهش وزن شدید حیوان در شرایط استرسی ممانعت کرده و حتی در حیوانات بدون استرس نیز سبب افزایش وزن گردد. از این رو به نظر می‌رسد این باکتری سویه مناسبی برای افزایش وزن و بهبود ضریب تبدیل غذایی در حیوانات است به نحوی که می‌تواند راندمان تولید را افزایش دهد.

از سوی دیگر این باکتری یک پروبیوتیک بومی ایران است که توسط تاج آبادی[3] و همکارن از ترخینه جدا شده و خصوصیات پروبیوتیکی آن در آزمون‌های صورت گرفته، اثبات شده است (۲۱). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که مصرف این باکتری علاوه بر ارتقای سطح ایمنی و افزایش مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا، با کاهش اثرات مخرب استرس می‌تواند در افرادی درگیر استرس‌های مزمن به کار گرفته شود. از این رو پس از انجام آزمون‌های بالینی می‌توان مصرف این باکتری را به عنوان یک فرآورده فراسودمند پیشنهاد نمود.

[1] Ijaz
[2] Sohail
[3] Taj Abadi

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1.Weatherby D, Ferguson S. Blood chemistry and CBC analysis: Weatherby & Associates, LLC; 2004.4(15):22-48.

2.Kale M, Bhusari K, Umathe S. Influence of various stressors on the thyroid function and to set up its correlation with the markers of oxidative stress in blood. Journal of molecules; 2008.4(5):5-9.

3.Hangalapura B, Nieuwland M, Buyse J, Kemp B, Parmentier H. Effect of duration of cold stress on plasma adrenal and thyroid hormone levels and immune responses in chicken lines divergently selected for antibody responses. Journal of poultry science. 2004;83(10):1644-1649.

4.Helmreich DL, Tylee D. Thyroid hormone regulation by stress and behavioral differences in adult male rats. Journal of hormones and behavior. 2011;60(3):284-291.

5.Rubello D, Sonino N, Casara D, Girelli M, Busnardo B, Boscaro M. Acute and chronic effects of high glucocorticoid levels on hypothalamic-pituitary-thyroid axis in man. Journal of endocrinological investigation. 1992;15(6):437-441.

6.Grubeck-Loebenstein B, Vierhapper H, Waldhäusl W, Nowotny P. Thyroid function in adrenocortical insufficiency during withdrawal and re-administration of glucocorticoid substitution. Journal of acta endocrinologica. 1983;103(2):254-258.

7.Samuels M, McDaniel P. Thyrotropin levels during hydrocortisone infusions that mimic fasting-induced cortisol elevations: a clinical research center study. Journal of Clinical endocrinology & metabolism. 1997;82(11):3700-3704.

8.Banos C, Tako J, Salamon F, Györgyi S, Czikkely R. Effect of ACTH-stimulated glucocorticoid hypersecretion on the serum concentrations of thyroxine-binding globulin, thyroxine, triiodothyronine, reverse triiodothyronine and on the TSH-response to TRH. Journal of Acta medica Academiae Scientiarum Hungaricae. 1979;36(4):381-394.

9.Comtois R, Hébert J, Soucy J-P. Increase in T3 levels during hypocorticism in patients with chronic secondary adrenocortical insufficiency. Journal of acta endocrinologica. 1992;126(4):319-324.

10.McCormack P, Thomas J, Malik M, Staschen C. Cold stress, reverse T3 and lymphocyte function. Journal of alaska medicine. 1998;40(3):55-65.

11.Brown-Grant K, Harris G, Reichlin S. The effect of emotional and physical stress on thyroid activity in the rabbit. Journal of physiology. 1954;126(1):29-40.

12.Fish LH, Schwartz HL, Cavanaugh J, Steffes MW, Bantle JP, Oppenheimer JH. Replacement dose, metabolism, and bioavailability of levothyroxine in the treatment of hypothyroidism. England Journal of Medicine. 1987;316(13):764-770.

13.Devdhar M, Ousman YH, Burman KD. Hypothyroidism. Journal of endocrinology and metabolism clinics of north america. 2007;36(3):595-615.

14.Paveliu MS, Bengea S, Paveliu FS. Generic Substitution issues: brand-generic substitution, generic-generic substitution, and generic substitution of narrow therapeutic index (NTI)/critical dose drugs. Journal of mædica. 2011;6(1):52-59.

15.Wallace TC, Guarner F, Madsen K, Cabana MD, Gibson G, Hentges E, Sanders ME. Human gut microbiota and its relationship to health and disease. Nutrition reviews. 2011;69(7):392-403.

17.Zareie M, Johnson-Henry K, Jury J, Yang P-C, Ngan B-Y, McKay DM, Soderholm JD, Perdue MH, Sherman PM. Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress. Journal of Gut. 2006;55(11):1553-1560.

18.Baos R, Blas J, Bortolotti GR, Marchant TA, Hiraldo F. Adrenocortical response to stress and thyroid hormone status in free-living nestling white storks (Ciconia ciconia) exposed to heavy metal and arsenic contamination. Journal of environmental health perspectives. 2006;114(10):1497-1503.

19.Munak A, Guyre PM, Holbrook NJ. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. Endocrine reviews. 1984;5(1):25-44.

20.Ottenweller JE, Natelson BH, Pitman DL, Drastal SD. Adrenocortical and behavioral responses to repeated stressors: toward an animal model of chronic stress and stress-related mental illness. Journal of biological psychiatry. 1989;26(8):829-841.

21.Taj abadi Ebrahimi M, Bahrami H, Ziyary Z. Tarkhineh source of probiotic lactic acid bacteria. The quarterly journal of animal physiology and development. 2011;4(12):1-8

www.SID.ir

Archive of SID

Investigation the effect of *Lactobacillus casei* TD_2 on thyroid hormones (T_3 and T_4) in male wistar rats under chronic restraint condition

Mahnaz Faraji [1], Hamidreza Mohajerani[2], Parvaneh Jafari[3]

1. Department of microbiology, Faculty of science, Islamic Azad University, Sceince and Research branch, Arak, Iran
2. Department of microbiology, Faculty of science, Islamic Azad University, Arak branch, Arak, Iran
3. Department of microbiology, Faculty of science, Islamic Azad University, Arak branch, Arak, Iran (correspond author)*

Received: 1394/08/12
Accepted: 1395/02/01

The thyroid gland is one of the largest endocrine glands in the body, which is located in the anterior neck and consists of two connected lobes. The thyroid gland produces and secretes thyroid hormones, the principal ones being thyroxine (T_4) and triiodothyronine (T_3), which is more active. These hormones control rate of use of energy sources, protein synthesis, and controls the body's sensitivity to other hormones, growth and rate of function of many other systems in the body. Hence, the control of these hormones is pretty critical in body and it can be affected by too many factors such as stress. The effect of stress on thyroid function is complex. However, changes induced by stress on the serotonergic system, which is part of brain function, and cortisol levels may affect thyroid hormones metabolism. Probiotics are alive microorganisms when administrated which confer health benefit on consumers when in adequate amount. Use of probiotics can control the thyroid hormones by controlling the stress conditions. We use 40 male wistar rats with the same age and weight in this experiments. After 2 weeks of adaptation, the rats were randomly divided in to 4 groups (n=10). Control groups daily gavaged with 1 ml of PBS buffer (pH:7.2), while the positive control restrained 15 min in restrainer for induction of Chronic restraint stress (CRS). The trail groups received 10^9 cfu of Lactobacillus case TD2 as probiotic by intra gastric gavage, while the Trail 2 group was CRS condition. After 3 weeks, rats were anaesthetized by inhalation of diethyl ether and blood samples were taken directly from their hearts. Then the level of thyroid hormones and glucose were assayed in blood serum. The results showed that the applied stress condition had no effect on T_3 concentration level (p value=0.575). T4 level significantly decreased in positive control group compare to negative control (p value=0.001). Administration of probiotic increased the level of T_4 to normal level and there was no significant difference between negative control and trial groups (p value=0.824). Stress caused significant increase in glucose level in positive control compare to negative control group (p value=0.0035). in trail groups the glucose concentrations were normal by use of probiotic (p value=0.9). The results of this experiment showed the *L. casei* TD_2 could control the changes in thyroid hormones possiblt by control the CRS condition.

Key words: Stress, Probiotic, T_3, T_4, thyroid hormones, *L. casei* TD_2

* p-jafari@iau-arak.ac.ir

www.SID.ir