معاونت پژوهش و فن آوری

به نام خدا

منشور اخلاق پژوهش

با یاری از خداوند سبحان و اعتقاد به این که عالم محضر خداست و همواره ناظر بر اعمال انسان و به منظور پاس داشت مقام بلند دانش و پژوهش و نظر به اهمیت جایگاه دانشگاه در اعتلای فرهنگ و تمدن بشری، ما دانشجویان و اعضاء هیئت علمی واحدهای دانشگاه آزاد اسلامی متعهد می گردیم اصول زیر را در انجام فعالیت های پژوهشی مد نظر قرار داده و از آن تخطی نکنیم:

۱- اصل حقیقت جویی: تلاش در راستای پی جویی حقیقت و وفاداری به آن و دوری از هرگونه پنهان سازی حقیقت.

۲- اصل رعایت حقوق: التزام به رعایت کامل حقوق پژوهشگران و پژوهیدگان (انسن،حیوان ونبات) و سایر صاحبان حق.

۳- اصل مالکیت مادی و معنوی: تعهد به رعایت کامل حقوق مادی و معنوی دانشگاه و کلیه همکاران پژوهش.

٤- اصل منافع ملی: تعهد به رعایت مصالح ملی و در نظر داشتن پیشبرد و توسعه کشور در کلیه مراحل پژوهش.

۵- اصل رعایت انصاف و امانت: تعهد به اجتناب از هرگونه جانب داری غیر علمی و حفاظت از اموال، تجهیزات و منابع در اختیار.

٦- اصل رازداری: تعهد به صیانت از اسرار و اطلاعات محرمانه افراد، سازمان ها و کشور و کلیه افراد و نهادهای مرتبط با تحقیق.

۷- اصل احترام: تعهد به رعایت حریم ها و حرمت ها در انجام تحقیقات و رعایت جانب نقد و خودداری از هرگونه حرمت شکنی.

۸- اصل ترویج: تعهد به رواج دانش و اشاعه نتایج تحقیقات و انتقال آن به همکاران علمی و دانشجویان به غیر از مواردی که منع قانونی دارد.

۹- اصل برائت: التزام به برائت جویی از هرگونه رفتار غیرحرفه ای و اعلام موضع نسبت به کسانی که حوزه علم و پژوهش را به شائبه های غیرعلمی می آلایند.

دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل دانشکده علوم پایه،گروه زیست شناسی

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد (M. Sc)

گرایش: بیوشیمی

عنوان

بررسی تاثیر عصاره هیدروالکلی گردوی سیاه بر بهبود عملکرد تیروئیدی در کم کاری تیروئید القا شده با متی مازول در رت های نر بالغ نژاد ویستار

استاد راهنما

دکتر امیر حسین اسماعیلی

نگارش

مریم فرامرزی

زمستان ۱۳۹۹

تقدیم به

سپاسگزاری

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

چکیده ۱
فصل اول: کلیات پژوهش ۲
۱-۱-مقدمه ۳
۱-۲-بیان مسئله ٤
۱-۳-اهداف پژوهش ٥
۱-٤-سوالات تحقیق ٦
۱-٥- فرضیه های پژوهش ۷
۱-٦-تعریف اصلاحات و متغیرها ۷
فصل دوم: پیشینه و ادبیات پژوهش ۹
۲-۱- جایگاه سیستماتیکی گردو ۱۰
۲-۲- گیاهان دارویی ۱۰
۲-۲-۱- موارد مهم در تولید گیاه دارویی ۱۲
۲-۲-۲- ویژگی های خاص تولید گیاهان دارویی ۱۳
۲-۲-۳- شکل های مصرف گیاهان دارویی ۱۳
۲-۲-٤- روش تهیه برخی از اشکال مصرفی داروهای گیاهی ۱٤
۲-۳- خصوصیات گیاه گردو ۱٤
۲-۳- ۱-پراکنش جغرافیایی ۱٥
۲-۳-۲ ارزش غذایی گردو ۱٦

۲-۳-۳- جایگاه گیاهان دارویی ۱۶
۲-۳-٤- ارزش دارویی برگ گردو ۱۷
۲-٤- غده تیروئید ۱۸
۲-٤-۱- آناتومی و بافت شناسی غده ۱۸
۲-٤-۲- هورمون‌های تیروئید ۲۰
۲-٤-۳- سنتز و ترشح هورمون‌های متابولیک تیروئید ۲۰
۲-٤-۳-۱- به دام انداختن یدید ۲۱
۲-٤-۳-۲- تشکیل و ترشح تیروگلبولین ۲۲
۲-٤-۳-۳- هیدرولیز تیروگلبولین ۲۳
۲-٤-۳-٤- اکسیداسیون یدید ۲٤
۲-٤-۳-۵- یددار شدن تیروزین و تشکیل هورمون تیروئید ۲٤
۲-٤-٤- سنتز T_3وT_4 ..... ۲۵
۲-٤-۵- هورمون TRH ۲٦
۲-٤-٦- سنتز TSH ۲٦
۲-٤-۷- اعمال فیزیولوژیک هورمون‌های تیروئید ۲۷
۲-٤-۸- اثرات هورمون تیروئید بر مکانیسم‌های اختصاصی بدن ۲۸
۲-٤-۸-۱- تحریک متابولیسم کربوهیدرات: ۲۸
۲-٤-۸-۲- تحریک متابولیسم چربی: ۲۸
۲-٤-۸-۳- تأثیر روی چربی‌های پلاسما و کبد: ۲۸
۲-٤-۸-٤- افزایش نیاز به ویتامین‌ها: ۲۸
۲-٤-۸-۵- افزایش متابولیسم پایه: ۲۹

۲-٤-۸-٦- کاهش وزن بدن: ۲۹
۲-٤-۹- اثر هورمون تیروئید بر دستگاه قلب و عروق..... ۲۹
۲-٤-۱۰- افزایش حرکات گوارشی: ۲۹
۲-٤-۱۱- اثرات تحریکی بر دستگاه اعصاب مرکزی: ۳۰
۲-٤-۱۲- اثر بر عملکرد عضلات:..... ۳۰
۲-٤-۱۳- لرزش عضلانی: ۳۰
۲-٤-۱٤- اثر بر روی خواب: ۳۰
۲-٤-۱۵- اثر هورمون تیروئید بر عملکرد جنسی: ۳۰
۲-٤-۱٦- اثرات بیولوژیک..... ۳۱
۲-٤-۱۷- بیماری های تیروئید..... ۳۱
۲-٤-۱۷-۱- کم کاری تیروئید ۳۱
۲-٤-۱۷-۲- پرکاری تیروئید ۳۲
۲-٤-۱۷-۳- بیماری خود ایمنی تیروئید ۳۲
۲-٤-۱۷-٤-گواتر و توده های تیروئید ۳۳
۲-٤-۱۷-۵- التهاب تیروئید ۳۳
۲-٤-۱۸- تیروئید و تشخیص آن ۳۳
۲-٤-۱۹- مواد ضد تیروئیدی ۳٤
۲-۵-مروری بر تحقیقات انجام شده ۳۵
فصل سوم: روش انجام پژوهش ۳۹
۳-۱-۲- وسایل، لوازم و دستگاههای غیر مصرفی ٤۱
۳-۲-روش تهیه عصاره گردو ٤۱

۳-۳- گروه بندی حیوانات ٤٣
۳-۳- ۱- روش تجویز دارو ٤٤
۳-۳-۲-روش بیهوش کردن حیوانات وخون گیری ٤٦
۳-۳-۲-۱- بیهوش کردن حیوانات ٤٦
۳-۳-۲-۲-خون گیری ٤٦
۳-۳-۳-۳-روش تهیه سرم و نگهداری آن ٤٧
۳-٤- بررسی ها و روش های تجزیه وتحلیل آماری ٦٢
فصل چهارم: نتایج ٦٤
٤-۱- مقدمه ٦٥
٤-۲-نتایج ٦٥
فصل پنجم: بحث ، نتیجه‌گیری و پیشنهادات ۷۳
٥-۱-بحث ۷٤
٥-۲- نتیجه‌گیری ۷۸
منابع ۸۰

فهرست جداول

عنوان صفحه

جدول۳-۱: گروه بندی و گاواژ موش ها ٤٤

جدول ٤-١ میانگین متغیرهای مورد بررسی در تیمارهای آزمایشی.....٦٦

فهرست نمودارها

عنوان صفحه

نمودار ٤-١ میانگین غلظت آنتی‌بادی ضد پراکسیداز تیروئید در تیمارهای آزمایشی ٦٧

نمودار ٤-٢ اثر تیمارهای آزمایشی بر غلظت هورمون محرک تیروئید ٦٧

نمودار ٤-٣ اثر تیمارهای آزمایشی بر غلظت هورمون تیروکسین (T4) ٦٨

نمودار ٤-٤ اثر تیمارهای آزمایشی بر میانگین غلظت هورمون تری یدوتیرونین (T3).....٦٩

نمودار ٤-٥ اثر تیمارهای آزمایشی بر میانگین غلظت لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL) ٧٠

نمودار ٤-٦ اثر تیمارهای آزمایشی بر میانگین غلظت لیپوپروتئین با چگالی پایین (LDL) ٧٠

نمودار ٤-٧ اثر تیمارهای آزمایشی بر میانگین غلظت کلسترول خون ٧١

نمودار ٤-٨ اثر تیمارهای آزمایشی بر میانگین غلظت تری‌گلیسرید خون (TG) ٧٢

فهرست اشکال

عنوان صفحه

شکل ۲-۱: برگ، دانه و پوست دانه گردو ۱۵
شکل۲-۲: غده تیروئید (۱۸) ۱۸
شکل۲-۳: ظاهر میکروسکوپی غده تیروئید (۱) ۱۹
شکل۲-٤: مکانیسم های سلولی تیروئید در انتقال یدید، تشکیل تیروکسین و تری تیرونین و رهایش تیروکسین و تری یدوتیرونین به داخل خون ۲۲
شکل۲-۵: تیروگلبولین ۲۳
شکل۲-٦: سنتز T_3، T_4 (۲۲) ۲۵
شکل ۲-۷: نمایی از ساختارهای شیمیایی PTU, MMI در قیاس با تیوره(۲) ۳۵
شکل۳-۱: جایگاه نگهداری حیوانات ٤۳
شکل۳-۲:روش وزن کشی حیوانات مورد آزمایش ٤۳
شکل۳-۳: روش تجویز دارو ٤٦
شکل۳-٤: روش خونگیری از موش ٤۷

چکیده

اختلالات تیروئیدی از بیماری های نسبتاً شایع در سراسر جهان می باشند. با توجه به عوارض داروهای شیمیایی، این مطالعه با هدف بررسی تاثیر عصاره هیدروالکلی گردوی سیاه بر بهبود عملکرد تیروئیدی در کم کاری تیروئید القا شده با متی مازول در رت های نر بالغ نژاد ویستار انجام شد.

مواد و روش ها: تحقیق از نوع تجربی-آزمایشگاهی (Experimental) با رات های بالغ نژاد ویستار در محدوده وزنی 20± 200 و در پنج گروه آزمایشی شش تایی (شاهد، تنش متی‌مازول، عصاره گردو، تنش متی‌مازول با عصاره گردو و تنش متی‌مازول با لووتیروکسین) (N=6) انجام شد. فراسنجه‌های خونی شامل آنتی‌بادی تیروئید پراکسیداز (Anti-TPO)، هورمون محرک تیروئید (TSH)، هورمون‌های تیروکسین (T4)، تری یدوتیرونین (T3)، لیپویروتئین‌های با چگالی بالا (HDL)، لیپویروتئین‌های با چگالی پایین (LDL)، کلسترول و تری‌گلیسرید اندازه‌گیری شد.جهت بررسی اثرات معنی‌دار تیمارها بر هر کدام از متغیرهای اندازه‌گیری‌شده، از متد تجزیه‌واریانس یکطرفه(ANOVA) استفاده شد. مقایسه میانگین‌های گروه‌های تیماری با آزمون توکی انجام شد.

نتایج این مطالعات نشان داد که عصاره هیدروالکلی گردوی سیاه سبب کاهش میزان سرمی هورمون محرک تیروئید (TSH) و افزایش هورمون‌های تری یدوتیرونین (T_3) و تیروکسین (T_4) گردید. لذا در این مطالعه ، عصاره گردوی سیاه بخاطر دارا بودن ترکیبات فلاونوئیدی فراون، سبب کاهش میزان سرمی هورمون محرک تیروئید و افزایش هورمون‌های تیروئیدی شده و باعث بهبود عملکرد تیروئید تحت شرایط هیپوتیروئیدیسم میشود.

کلمات کلیدی: عصاره گردوی سیاه ، کم کاری تیروئید ، هورمون T_3 و T_4، متی مازول

فصل اول: کلیات پژوهش

۱-۱-مقدمه

همزمان با گسترش استفاده از [illegible] سال های گذشته استفاده از گیاهان دارویی تا اندازه زیادی منسوخ شد. ولی به علت ظاهر شدن عوارض نامطلوب جانبی ترکیبات سنتتیک و عدم سازگاری آنها با انسان بار دیگر توجه دانشمندان و محققین به گیاه درمانی و ترکیبات اثر بخش موجود در گیاهان دارویی معطوف گردیده است.

غده تیروئید پروانه ای شکل بوده و درقسمت عرضی حنجره در جلو گلو قراردارد. این غده جزء بزرگترین غدد اندوکرین بوده که خود از دولوب تشکیل شده است البته درقسمت مرکزی دارای بخشی به نام لوب هرمی بوده که سبب اتصال دولوب تیروئیدی به یکدیگر میگردد. واحدهای تشکیل دهنده غده تیروئید آسینوس یا فولیکول بوده که در قسمت مرکزی آن ما پروتئین های کلوئیدی راداریم که خود به عنوان انباری به منظور ذخیره هورمون تیروئید میباشد و دارای چهارعملکرد اصلی میباشد: جذب و انتقال ید، ساخت و ترشح تیروگلوبین، اتصال ید به تیروگلوبین به منظور ساخت هورمون های تیروئیدی و ترشح هورمون تیروئید به دستگاه گردش خون این غده هم در متابولیسم بافت ها نقش دارد.(۱)

هورمون های تیروئیدی شامل تترایدوتیرونین یاT_4 ، تری یدوتیرونین یا T_3 و RT_3 تری یدوتیرونین معکوس میباشد لازم به ذکراست که هورمون کلسی تونین نیز توسط غده تیروئید سنتز میشود. هورمون TSH که به وسیله سلول‌های غده هیپوفیز قدامی ترشح می‌شود در کنترل عملکرد تیروئید نقش محوری داشته و مفیدترین نشانگر فیزیولوژیک فعالیت هورمون تیروئید است. عامل اصلی تعیین نقطه تنظیم در محور تیروئید هورمون TSH است. ترشح این هورمون به وسیله هورمون هیپوتالاموسی TRH تنظیم می‌شود.(۱)

با توجه به این که عصاره گردو دارای ترکیبات مختلف می باشد احتمال دارد که بر روی هورمون های تیروئید موثر باشد.

هدف از این پژوهش مشخص کردن اثرات احتمالی عصاره هیدروالکلی گردو بر سطوح پلاسمایی هورمون های تیروئید (T_4،T_3) و TSH بر بهبود عملکرد تیروئیدی در کم کاری تیروئید القا شده با متی مازول در رت های نر بالغ نژاد ویستار می باشد.

۱-۲-بیان مسئله

بیماری های تیروئید از شایع ترین بیماری های غدد درون ریز می باشند که پزشکان در هر رشته بالینی با آن مواجه هستند. تفاوت های جنسیتی بارزی در شیوع بیماریهای تیروییدمشاهده می شود به طوری که آمار ابتلا در زنان ۲ تا ٤ برابر مردان است. شیوع بیماری های تیروئید در تمام نقاط دنیا در هر وضعیت اقتصادی و اجتماعی بالا می باشد و تفاوت مشاهده شده در مناطق مختلف در نوع بیماری تیروئید و علت آن است. در جوامع بدون مشکل کمبود ید، شیوع کم کاری تیروئید حدود ۱ تا ۲ درصد است که با افزایش شیوع افزایش می یابد(۱).

متی مازول از خانواده داروهای آنتی تیروئیدی، کلاس تیونامیدها (Thionamides) بوده که برای کنترل و درمان پرکاری تیروئید به کار می رود. متی مازول، سنتز هورمون های تیروئیدی را در غده تیروئید مهار می کند. در واقع، این دارو از تشکیل هورمون های تیروئیدی از یدورها و تیروزین جلوگیری می کند. بخشی از مکانیسم عمل این دارو، مهار آنزیم تیروئید پراکسیداز است که برای یددار شدن تیروزین، ضروری است و بخشی دیگر، جلوگیری از مزدوج شدن دو تیروزین یددار برای تشکیل تیروکسین یا تری یدوتیرونین است(۲). باتوجه به شیوع بیماری کم کاری تیروئید در جوامع امروزی و اهمیت هورمون های تیروئیدی برعملکرد

سیستم های ایمنی و تنظیم متابولیسم همچنین عوارض زیاد داروهای شیمیایی نیاز به داروهایی با حداقل عوارض و درجه اطمینان زیاد که بتوان از آنها برای مدت زمان طولانی استفاده نمود. گیاهان دارویی از جمله ترکیبات طبیعی بوده که عوارض جانبی آنها کمتر بوده و در طب سنتی در درمان بسیاری از بیماری های مختلف استفاده شده است.

گردو(Juglans regial) متداول ترین درخت میوه دار در جهان می باشد. این درخت را به نام های گردوی ایرانی، گردوی سفید، گردوی انگلیسی که متعلق به خانواده ی (Jugland acea) با نام علمی Juglans regia می باشد. گردو یکی از گیاهان دارویی است که بطور سنتی در درمان بسیاری از بیماری ها مثل درد معده، آسم، اگزما، بیماری های پوستی، سینوزیت، بیماری های غدد درون ریز و بیماری های عفونی و انگلی مورد استفاده قرار می گیرد. ترکیبات موجود در آن دارای خواص ضد میکروبی و آنتی اکسیدانتی می باشد(۳).

از آنجایی که بیماری هایپوتیروئیدیسم(کم کاری تیروئید) ازجمله بیماری انسانی که در نتیجه اختلالات خود ایمنی و کمبود ید در رژیم غذایی روزانه بوجود می آید و همچنین مطالعات نشان داده است که گردوی سیاه(Black walnut) دارای مقادیر فوق العاده ای از ید می باشد و همچنین مصرف بالای آن در رژیم غذایی ایرانی ها(صبحانه، خورشت فسنجان) و از آنجایی که تاثیر عصاره هیدروالکلی گردوی سیاه برروی بر بهبود عملکرد تیروئیدی در کم کاری القاء شده با متی مازول در رت های ویستارمورد بررسی و مطالعه قرار نگرفته است این تحقیق انجام شده است.

۱-۳-اهداف پژوهش

هدف کلی:

بررسی تاثیر عصاره هیدرو الکلی گردوی سیاه بر بهبود عملکرد تیروئیدی در کم کاری القاء شده با متی مازول در رت های ویستار

اهداف جزئی:

۱- بررسی تاثیر عصاره ی هیدرو الکلی گردوی سیاه بر سطح هورمون T3 در رت های القایی کم کاری تیروئید با متی مازول

۲- بررسی تاثیر عصاره ی هیدرو الکلی گردوی سیاه بر سطح هورمون T4 در رت های القایی کم کاری تیروئید با متی مازول

۳- بررسی تاثیر عصاره ی هیدرو الکلی گردوی سیاه بر سطح هورمون TSH در رت های القایی کم کاری تیروئید با متی مازول

٤- بررسی تاثیر عصاره ی هیدرو الکلی گردوی سیاه بر سطح هورمونAnti-Tpo(تیروئد پیراکسیداز) در رت های القایی کم کاری تیروئید با متی مازول

۱-٤-سوالات تحقیق

سوال اصلی :

آیا عصاره هیدرو الکلی گردوی سیاه باعث بهبود عملکرد تیروئید در کم کاری القا شده تیروئید با متی مازول می شود؟

سوالات فرعی :

۱-آیا بین عصاره هیدروالکلی گردوی سیاه و عملکرد تیروئید رابطه وجود دارد؟

۲-آیا عصاره هیدروالکلی گردوی سیاه باعث بهبود کم کاری القا شده تیروئید با متی مازول میشود؟

۳- آیا عصاره هیدرو الکلی گردوی سیاه باعث تقویت سطوح TSH,T4,T3 در رت های القایی کم کاری تیروئید با متی مازول می شود؟

۱-۵- فرضیه های پژوهش

فرضیه‌اصلی :

عصاره ی هیدرو الکلی گردوی سیاه با بهبود عملکرد هورمونهای تیروئیدی در رت های القایی کم کاری تیروئید در ارتباط می باشد

فرضیه های فرعی :

عصاره هیدروالکلی گردوی سیاه با افزایش سطح T3 در رت های القایی کم کاری تیروئید با متی مازول در ارتباط می باشد.

عصاره هیدروالکلی گردوی سیاه با افزایش سطح T4 در رت های القایی کم کاری تیروئید با متی مازول در ارتباط می باشد.

عصاره هیدروالکلی گردوی سیاه با افزایش سطح TSH در رت های القایی کم کاری تیروئید با متی مازول در ارتباط می باشد.

عصاره هیدروالکلی گردوی سیاه با افزایش سطحAnti-tpo در رت های القایی کم کاری تیروئید با متی مازول در ارتباط می باشد.

۱-٦-تعریف اصلاحات و متغیرها

عصاره هیدروالکلی:

مواد موثر موجود در گیاه که به وسیله حلال های مختلف استخراج می گردند

کم کاری تیروییید :

حالتی از بیماری در انسان و حیوانات است که بر اثر کمبود تولید هورمون توسط غده ی تیروئید ایجاد می گردد. بیشتر این بیماران ابتدا دچار تیروئیدیت[1] می گردند که به معنی التهاب تیروئید است. این امر موجب تخریب پیشرونده و سرانجام فیبروز غده و در نتیجه کاهش یا فقدان ترشح هورمون تیروئید می شود(٤).

متی مازول : داروی متی مازول بررای درمان هیپرتیروئیدی توصیه می شود.این دارو افزایش ترشح هورمون های تیروئیدی را مهارمی کند زیرا از طریق ممانعت لز اتصال ید به تیروزین و جفت شدن یدوتیروزین ها باعث مهار ساخت هورمون تیروئیدمی شود(٥).

1 Thyroiditis

فصل دوم: پیشینه و ادبیات پژوهش

۲-۱- جایگاه سیستماتیکی گردو

بر اساس طبقه بندی لینه گیاه شناس سوئدی جایگاه سیستماتیکی کردو به صورت زیر مشخص گردیده است:

فرمانرو: گیاهان

شاخه : گیاهان گلدار

زیرشاخه: نهاندانگان

رده: دولپه‌ای‌های نو

زیررده: گیاهان بدون گلبر

راسته: Amentales

تیره: Juglandaceae

جنس: Juglans

۲-۲- گیاهان دارویی

گیاهان دارویی گیاهانی هستند که یک یا برخی از اندام‌های آنها حاوی ماده مؤثره است. این ماده که کمتر از۱٪ وزن خشک گیاه را تشکیل می‌دهد، دارای خواص دارویی مؤثر بر موجودات زنده است. همچنین کاشت، داشت و برداشت این گیاهان به منظور استفاده از ماده موثره ی آنها انجام می‌گیرد.

گیاهان دارویی از ارزش و اهمیت خاصی در تأمین بهداشت و سلامتی جوامع هم به لحاظ درمان و هم پیشگیری از بیماریها برخوردار بوده و هستند. این بخش از منابع طبیعی قدمتی همپای بشر داشته و یکی از

مهمترین منابع تأمین غذایی و دارویی بشر درطول نسل ها بوده اند. از نقطه نظر تاریخی، گیاهان اهمیت فراوانی در توسعه جوامع داشته اند و تحقیقات وسیعی برای یافتن فرآورده ها ومواد طبیعی دارویی گیاهی در طول تاریخ انجام شده، اما نکته حائز اهمیت اینجاست که تنها کمتر از ۱۰ درصد از مجموع ۲۵۰۰۰۰ گونه گیاهی جهان برای بیش از یک عملکرد زیست شناختی، شناسایی و مورد استفاده قرار گرفته اند. بر اساس آمارهای منتشره توسط (WHO)[۲] ، تنها بین ۳۵ تا ۷۰ هزار گونه گیاه دارویی در طول زمان برای حداقل یک یا چند بار مورد مصرف قرار گرفته است. در حال حاضر، ۲۵ درصد از داروهای موجود، منشأ گیاهی دارند و ۱۲درصد داروها نیز از منابع میکروبی ساخته شده اند. پتانسیل تولید داروهای گیاهی در طبیعت بسیار بالاست. برای نمونه گفته می شود ۱۲۵۰۰۰ گونه گیاه دارویی در جنگلهای استوایی جهان یافت می شود. ارزش اقتصادی و تجاری گیاهان دارویی فوق العاده زیاد است. در بعضی آمارها ارزش تجارت جهانی گیاهان دارویی بالغ بر ٤۳میلیارد دلار در سال برآورد شده و طی آمار منتشره شده فروش فرآورده های گیاهی در سال ۱۹۹۷ بالغ بر ۲٤/۳ میلیارد دلارآمریکا بوده است. (٦).

گرایش عمومی جامعه به استفاده از داروها و درمانهای گیاهی و به طور کلی فرآورده های طبیعی به ویژه در طی سالهای اخیر روبه افزایش بوده و مهمترین علل آن، اثبات اثرات مخرب و جانبی داروهای شیمیایی از یک طرف و ایجاد آلودگی های زیست محیطی که کره زمین را تهدید می کند از سوی دیگر بوده است. بیش از ٦۰ درصد مردم آلمان و بلژیک و ۷٤ درصد انگلیسی ها تمایل به استفاده از درمانهای طبیعی گیاهی دارند. ضمن اینکه طبق آمار سازمان بهداشت جهانی بالغ بر ۸۰ درصد مردم جهان به ویژه در کشورهای در حال توسعه و نواحی فقیر و دور افتاده عمده ترین نیازهای درمانی خود را از گیاهان دارویی تأمین می کنند. از سوی دیگر گیاهان دارویی جزء ذخایر و منابع طبیعی هستند و بسیاری از کشورها کم یا زیاد از یک چنین منبعی

2 - World Health Organization

برخوردارند که نوع، تعداد و تنوع گونه های گیاهی بر اساس شرایط و موقعیت جغرافیایی هر منطقه متفاوت است. متأسفانه سودآوریهای کلان اقتصادی و توجه روز افزون به تجارت جهانی گیاهان دارویی، مشکلات و مسائل ناگواری را برای این منابع به وجود آورده و نسل گونه های گیاهی را با خطر انقراض مواجه ساخته است. چرا که بخش عظیمی از تجارت، مربوط به گونه های گیاهی دارویی است که از طبیعت جمع آوری شده و بعضاً با شیوه های نادرست، نه تنها به انقراض نسل گونه ها می انجامد بلکه تنوع زیستی منطقه و جهان را نیز با خطر نابودی مواجه می سازد. استفاده مطلوب، منطقی و بهینه از این منابع که به لحاظ فناوری بسیار کم هزینه تر و ساده تر از صنایع دارویی شیمیایی است، می تواند ضمن تأمین بخشی از نیازهای عمده بهداشتی و درمانی جامعه از خروج مقادیر متنابهی ارز جلوگیری نموده و مانع گسترش وابستگی به بیگانگان شود. بنابراین با اتخاذ سیاستها و راهکارهای مناسب و مبتنی بر یک شناخت واقع گرایانه از وضعیت موجود این منابع و کاربرد روشهای علمی و صحیح در تمام ابعاد اعم از کاشت، داشت، برداشت و بهره برداری صنعتی و اقتصادی آن، چه از طبیعت وچه به صورت کشت مکانیزه، میتوان به درکی واقعی و اصولی در خصوص نقش و بازدهی گیاهان دارویی در جوامع رو به رشدی همچون ایران رسید و علاوه بر حفظ و حراست از این سرمایه های ملی به شکوفایی و توسعه پایدار جامعه نیز دست یافت.(٦)

۲-۲-۱- موارد مهم در تولید گیاه دارویی

اگر نحوه آماده سازی داروهای گیاهی و تحویل آنها به مردم به نحو صحیح انجام نگیرد خواص درمانی گیاه از بین رفته یا تقلیل می‌یابد که این امر موجب عدم تأثیر گیاه در درمان بیماری می‌گردد.

از مواردی که باعث کاهش اثر بخشی گیاه می‌گردد: کشت در زمینی که از نظر مواد خاص مورد نیاز گیاه، دچار کمبود باشد، عدم مبارزه صحیح با آفات و بیماریهای گیاهان دارویی کشت شده که اغلب موجب کاهش مواد

مؤثر گیاه یا تغییر نسبت ترکیبات مفید گیاه می‌گردند، رعایت نکردن زمان مناسب برداشت (برحسب وضعیت هوا و ساعات روز)، خشک کردن گیاه در شرایط نامناسب (از نظر درجه حرارت، مدت زمان خشک کردن یا سرعت خشک کردن و...)، عدم نگهداری صحیح و بسته‌بندی مناسب (فرّار بودن برخی ترکیبات، آلودگی گیاه برداشت شده به قارچ یا باکتری و...)، تقلبات دارویی (برخی از اوقات به‌عمد یا غیرعمدی، گیاهی به‌عنوان گیاه دیگر به صرف داشتن ظاهر مشابه فروخته می‌شود و این مسأله علاوه بر اینکه در سطح گونه گیاهی – به فراوانی – اتفاق می‌افتد، گاهی در حد جنس گیاه نیز صورت می‌گیرد).(۷)

۲-۲-۲- ویژگی های خاص تولید گیاهان دارویی

ویژگی های خاص تولید گیاهان دارویی را می توان به صورت زیر نام برد:

۱) تنوع زیادی در گیاهان و گونه های دارویی وجود دارد.

۲) مواد مؤثره آنها دارای اهمیت فوق العاده ای است.

۳) شرایط اگرواکولوژیکی تأثیر شگرفی بر مواد مؤثره آنها دارد.

٤) تجارت آنها نسبتاً کم، قیمت شان ناپایدار و در تجارت آنها رقابت جهانی وجود دارد.

۲-۲-۳- شکل های مصرف گیاهان دارویی

گیاهان دارویی و معطر عمدتا به فرمهای زیر مصرف می شوند:

۱) گیاه تازه

۲) گیاه خشک شده یا کنسرو شده

۳) بصورت فرآوری شده توسط حرارت

٤) استحصال مواد موثره در صنعت

۲-۲-٤- روش تهیه برخی از اشکال مصرفی داروهای گیاهی

دم کرده:

مقدار تعیین شده از پودر گیاه را، در مقدار معینی از آب جوش ریخته و به بهم می‌زنند. بعد روی ظرف را پوشانده و به مدت ۳۰-۱۵ دقیقه صبر می‌کنند سپس آن را صاف می‌کنند.

جوشانده:

۱.جوشانده ملایم: مقدار معینی از گیاه خردشده را با ۱/٤ لیتر آب جوش مخلوط کرده، آن را کمی می‌جوشانند. سپس آن را از حرارت دور کرده، صبر می‌کنند تا دم بکشد. سپس آن را صاف می‌کنند.

۲.جوشانده معمولی: تفاوت آن با جوشانده ملایم در افزایش زمان جوشش است.

خیسانده:

این شکل برای مواد مؤثری که در اثر حرارت از بین می‌روند، توصیه می‌شود. برای تهیه خیسانده- ی سرد، مقدار مشخصی از پودر گیاه را در حجم معینی از آب ریخته، درِ ظرف را ٦ الی ۱۲ ساعت می‌بندند. سپس محتویات ظرف را صاف می‌کنند.(۸)

۲-۳- خصوصیات گیاه گردو

درخت گردو با نام علمی Juglans regia یکی از درختان مهم از خانواده Juglandaceae $n = 16$ و گونه $2n = 32$ دیپلوئید است. این گیاه از تیره گردو سانان می باشد. مغز ساقه های درخت گردو لایه لایه، تنه صاف با پوست فلسی و شیاردار، برگهای مرکب شانه ای دارد و درخت یک پایه محسوب می‌شود، گلهای نر آن در کنار شاخه های یک ساله و روی گل آذین سنبله دم گربه ای (شاتون) و گل های ماده آن در نوک شاخه های سال جاری در گروههای یک الی سه تایی و در برخی از ارقام گردو در کنار شاخه های سال جاری

حاصل می شوند. گرده افشانی گردو توسط باد انجام می گیرد. عمل گرده افشانی و تلقیح در اوایل بهار می باشد. میوه های گردو از نوع فندقه بوده که در آن فرابر میوه چوبی شده و توسط پوست سبز که منشاء برگ دارد، احاطه می شوند. گردوهای جوان و تازه به بار نشسته حالت ناهمرسی از نوع نر پیش رسی نشان می دهند، در ایران به طور خودرو در جنگل های شمال ایران و مناطقی نظیر آستارا، طالش، رودبار و بندر گز وجود دارد و در باغ های سایر مناطق کشور نیز کاشته می شود.

شکل ۲-۱: برگ، دانه و پوست دانه گردو

۲-۳- ۱-پراکنش جغرافیایی

نام های دیگر این گیاه در ایران عبارت اند از: جوز، چهارمغز، قز، گردکان، جویز و آقوز. در انگلیسی و فرانسه به درخت گردو به ترتیب Walnut و Noyer می گویند که در بسیاری از مناطق دنیا از جمله در عرض جغرافیایی ۳۹-۲۹ درجه شمالی و طول جغرافیایی ٦٥-٤٥ درجه شرقی از زمین های کم ارتفاع با ارتفاعی کمتر از ۱۰۰۰ متر تا مناطقی به ارتفاع ۲۵۰۰ متر به صورت اهلی و وحشی در شمال و غرب و مرکز کشور ایران گستردگی و پراکندگی دارد. گردو درختی مهم و چندمنظوره می باشد به طوری که در باغبانی به خاطر میوه و

در جنگل کاری برای چوب با ارزش آن و در داروسازی به عنوان یک گیاه دارویی و همچنین در احداث پارکها می تواند به عنوان یک گیاه زینتی مورد استفاده قرار گیرد (۹).

۲-۳-۲ ارزش غذایی گردو

گردو به دلیل داشتن اسیدهای چرب غیراشباع به عنوان یکی از مهم ترین خشک میوه ها از نظر ارزش غذایی مطرح است. در طب سنتی برگ گردو به عنوان کاهنده قند خون شناخته شده است (۱۰).

۲-۳-۳- جایگاه گیاهان دارویی

مصرف گیاهان دارویی در طب سنتی جایگاه خاصی داشته و از سال ها قبل برای درمان بسیاری از بیماریها، مصرف اشکال متفاوتی از گیاهان دارویی مختلف کاربرد داشته است. مصرف این گیاهان در منطقه آسیا از جمله ایران، هند، چین و بعضی از کشورهای آفریقایی مانند مغرب متداول تر می باشد. در کشور مغرب چهارده نمونه از گیاهان دارویی برای درمان دیابت استفاده شده است که از این میان می توان به برگ گردو اشاره نمود (۱۱).

در مطالعه ای دیگر در کشور مغرب، ۳۲۰ بیمار دیابتی و ۳۸۰ بیمار مبتلا به فشار خون و اختلالات قلبی-عروقی مورد مطاله قرار گرفتند که ۸۰ درصد این افراد گیاهان دارویی را برای درمان بیماری خود مصرف می کردند و معتقد بودند که گیاه درمانی ارزان تر، مؤثرتر و بهتر از درمان دارویی است (۱۲).

مصرف گیاهان دارویی به دلیل داشتن عوارض جانبی کمتر (۱۳).

نسبت به داروهای شیمیایی، ارجحیت دارند؛ نتایج برخی مطالعات قبلی نشان داده است که مصرف دم کرده برگ گردو و زیتون اثر کاهش دهنده مقدار قند خون در مبتلایان به دیابت دارد (۱٤).

۲-۳-٤- ارزش دارویی برگ گردو

امروزه ترکیبات آنتی اکسیدانی موجود در میوه جات و سبزیجات بسیار مورد توجه واقع شده اند و نقش مهمی در حفظ سلامت و پیشگیری از بیماریها ایفا می کنند. فشار مصرف کنندگان برای اجتناب از استفاده ترکیبات ضدمیکروبی شیمیایی و همچنین افزایش مقاومت بدن به آنتی بیوتیک های سنتزی منجر به رشد فزاینده به استفاده از این ترکیبات طبیعی در صنایع غذایی شده است (۱۵).

در راستای حذف و یا کاهش افزودنی های شیمیایی در مواد غذایی تحقیقات زیادی برای جایگزین کردن مواد شیمیایی با مواد طبیعی انجام شده است؛ در همین زمینه تلاش های زیادی برای یافتن آنتی اکسیدان های طبیعی از منابع گیاهی صورت گرفته است، برگ و پوسته گردو جزء محصولات جانبی گردو می باشند و بنابراین جز منابع ارزان قیمت حاوی آنتی اکسیدان های طبیعی می باشند؛ این در حالی است که تولید مواد سنتزی هزینه بالایی را می طلبد. نظر به این که گیاهان یکی از منابع مهم آنتی اکسیدان ها می باشند، تحقیقات در این زمینه رو به افزایش می باشد. گیاهان غنی از ترکیبات آنتی اکسیدانی می توانند باعث حفاظت سلول ها از آسیب های اکسیداتیو شوند (١٦).

برگ گردو منبعی غنی از ترکیبات محافظ سلامت است که به طور قابل توجیهی برای نارسایی وریدی و بیماری بواسیر کاربرد دارد (۱۷).

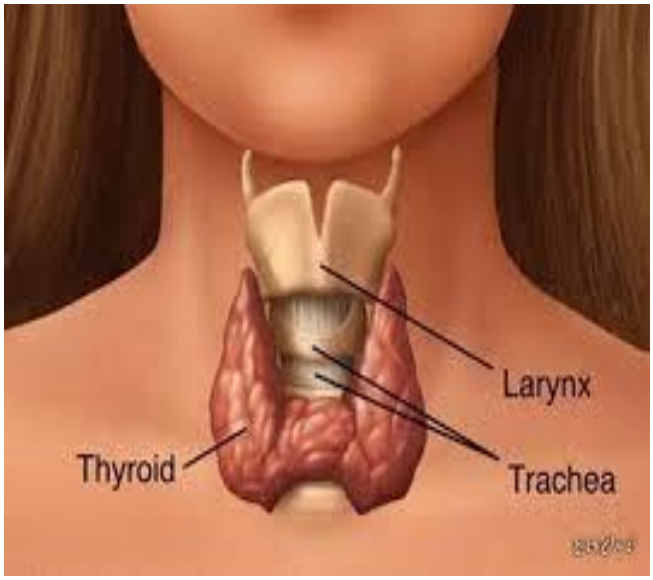
در طب سنتی برگ گردو برای معالجه ورم مفاصل، آنژین و شستشوی زخم ها به کار می رود (۱۰).

در تحقیقات اخیر نیز اثرات ضد میکروبی آن علیه باکتری ها گزارش شده است (۱۷). همچنین برگ گردو غنی از ترکیبات آنتی اکسیدان است که می تواند رشد سلولهای سرطانی را مهار کند (۱۳).

۲-٤- غده تیروئید

۲-٤-۱- آناتومی و بافت شناسی غده

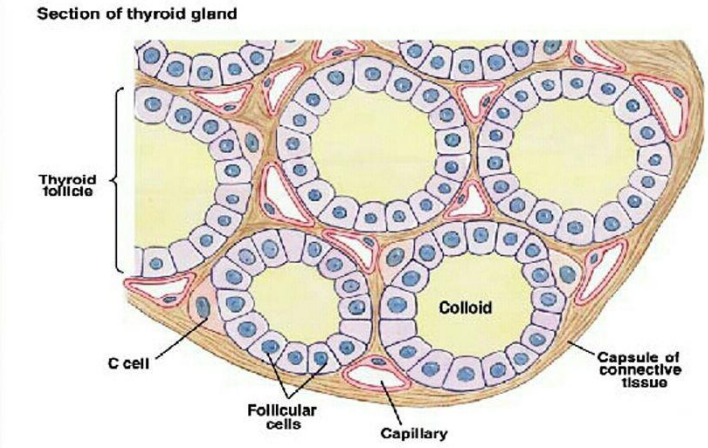
تیروئید، غده‌ای است پروانه ای شکل به وزن تقریبی ۳۰ گرم و به رنگ قرمز تند که توسط کپسولی از جنس بافت همبند احاطه شده است.(شکل۲-۲) تیروئید از دو لوب که توسط قطعه رابطی به هم متصل‌اند، به وجود آمده است. لوب‌های تیروئید به طول ۵ سانتی‌متر و عرض و ضخامت ۲ سانتی‌متر، از غدد نسبتا درشت درون‌ریز بدن می‌باشد که در طرفین نای و حنجره و مجاور غلاف شریان کاروتید قرار گرفته‌اند. رابط تیروئید، ایسموس [۳] نامیده می‌شود و مقابل حلقه دوم و سوم نای قرار دارد. تیروئید از شریان‌های تیروئیدی فوقانی و تحتانی خون می‌گیرد.(۱۸)



شکل۲-۲: غده تیروئید (۱۸)

1- Isthmus

بافت تیروئید، از بیش از یک میلیون آسینی[۴] یا فولیکول‌های بسته، ساخته شده است که قطر هر کدام ۱۰۰ تا ۳۰۰ میکرومتر است. دیواره هر فولیکول از یک ردیف بافت پوشش مکعبی ساخته شده و فضای درون فولیکول از ماده‌ای به نام کلوئید[۵] پر شده، از سلول های اپیتالی مکعبی مفروش شده که به داخل فولیکول ها ترشح می شود. جزء اصلی کلوئید گلیکوپروتیئن بزرگی موسوم به تیروگلبولین است که حاوی هورمون های تیروئید است. فولیکول‌های بسته تیروئید در مجموعه‌های بیست تا چهل فولیکولی به نام لوبول قرار گرفته‌اند.(شکل۲-۳) در بافت تیروئید و در بین فولیکول‌های بسته، تعدادی سلول دیگر نیز به نام سلول‌های پارافولیکولی وجود دارند که هورمون فرعی تیروئید یا همان کلسی‌تونین که برای متابولیسم کلسیم می‌باشد، را می‌سازند.انشعابات رگ‌های خونی در بافت تیروئید بسیار گسترده است که خون‌رسانی به بافت تیروئید و ورود هورمون‌های تیروئید به خون را آسان می‌کند. شاخه‌ای از اعصاب سمپاتیک گردنی و پاراسمپاتیک(عصب واگ) به تیروئید می‌رسد. (۱)



شکل۲-۳: ظاهر میکروسکوپی غده تیروئید (۱)

2-Acini
1-Colloid

۲-٤-۲- هورمون‌های تیروئید

تیروئید، دو نوع هورمون اصلی(یددار) و فرعی ترشح می‌کند که به ترتیب به وسیله سلول‌های دیواره فولیکول‌ها و سلول‌های پارافولیکولی ساخته می‌شوند. هورمون‌های اصلی تیروئید شامل تیروکسین (تترایدوتیرونین[۶]) و تری‌یدوتیرونین[۷] و به مقدار جزئی چند هورمون یددار دیگر است. تیروکسین به علت دارا بودن چهار اتم ید، T_4و تری‌یدوتیرونین به علت داشتن سه اتم ید، T_3 خوانده می‌شود. سلول‌های دیواره فولیکول‌ها از تیروزین[۸] که یکی از اسیدهای آمینه موجود در خون است، پروتئینی به نام تیروگلوبولین می‌سازد و آن را در فضای وسط فولیکول انبار می‌کنند.(۱۸)

۲-٤-۳- سنتز و ترشح هورمون‌های متابولیک تیروئید

حدود ۹۳ درصد هورمون‌های متابولیک فعالی که از غده تیروئید ترشح می‌شوند، تیروکسین بوده و ۷ درصد آن تری‌یدوتیرونین است. گرچه همه تیروکسین‌ها نهایتا در بافت‌ها به تری‌یدوتیرونین تبدیل می‌شوند به طوری که هردو از نظر عملکرد مهم هستند. اعمال این دو هورمون از نظر کیفی مشابه بوده، اما از نظر سرعت و شدت عمل متفاوت هستند. تری یدوتیرونین حدود چهار برابر قوی تر از تیروکسین است، اما در مقادیر بسیار کمتری در خون وجود داشته، نسبت به تیروکسین برای مدت کوتاه تری پایدار می ماند. هورمون های تیروئید از این لحاظ منحصر به فرد هستند که برای فعالیت بیولوژیکی خود نیاز به عضو کمیاب ید دارند. غده تیروئید باید ترکیب ید را سنتز کند که این سنتز در مولکول تیرو گلوبین انجام می گیرد. (۱۹)

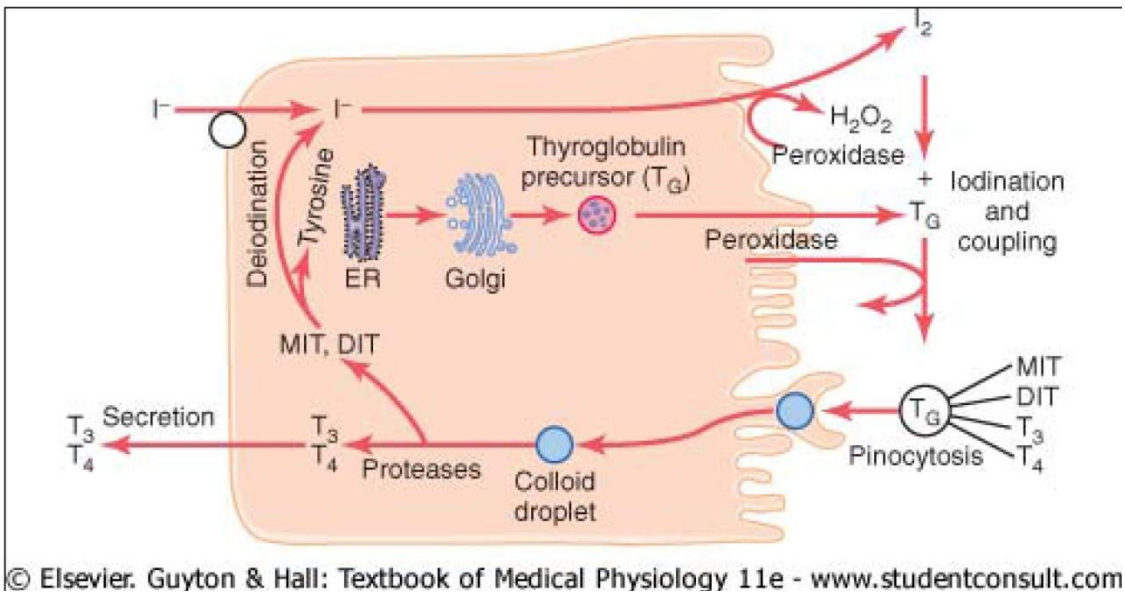
1-Tetraiodothyronine
2-Triiodothyronine
3-Tyrosine

۲-٤-۳-۱- به دام انداختن یدید

مرحله اول در تشکیل هورمون تیروئید انتقال یدیدها از خون به داخل سلول های غده تیروئید و فولیکول هاست. غشای پایه سلول تیروئیدی توانایی ویژه ای برای پمپ کردن فعال یدید به داخل سلول ها دارد. این کار توسط عمل هم انتقالی سدیم-یدید صورت می گیرد که به طور توام یک یون یدید را به ازای هر یون سدیم از غشای قاعده ای جانبی به داخل سلول انتقال می دهد. انرژی انتقال یدید در خلاف جهت شیب غلظتی از پمپ سدیم- پتاسیم ATPase حاصل می شود که سدیم را به خارج سلول پمپ کرده،بدین وسیله غلظت داخل سلولی پایین سدیم و شیبی برای انتشار تسهیل شده سدیم به داخل سلول ایجاد می کند. (شکل۲-٤)

این فرایند تغلیظ یدید در سلول به دام انداختن یدید [۹]نامیده می شود.در غده طبیعی، پمپ یدید، یدید را حدود ۳۰ برابر غلظت خونی اش تغلیظ می کند. وقتی غده تیروئید به طور حداکثر فعال می شود، این نسبت تغلیظ می تواند تا حدود ۲۵۰ برابر افزایش یابد. سرعت به دام انداختن یدید توسط تیروئید توسط عوامل چندی تحت تاثیر قرار می گیرد که مهمترین آنها غلظت TSH است؛ TSH فعالیت پمپ یدید در سلول های تیروئیدی را تحریک می کند.(۲۰)

1-Iodide Trapping

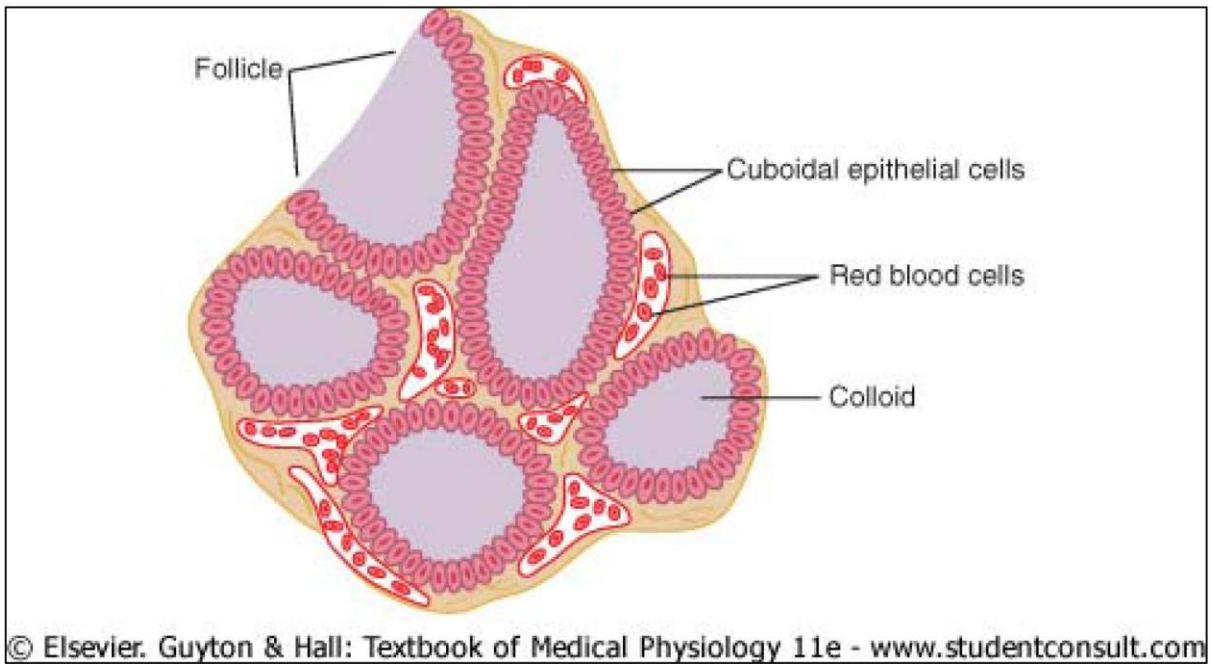


شکل۲-٤: مکانیسم های سلولی تیروئید در انتقال یدید، تشکیل تیروکسین و تری تیرونین و رهایش تیروکسین و تری یدوتیرونین به داخل خون

۲-٤-۳-۲- تشکیل و ترشح تیروگلبولین[۱۰]

تیروگلوبین ماده پیش ساز T_3 و T_4 ، یک پروتئین گلوکوزیله ی بزرگ و ید دار است. تیروگلبولین از دو زیر واحد تشکیل شده است که در ساختمان آن ۱۱۵ ریشه ی تیروزین وجود دارد که هر یک می تواند جایگاه اضافه شدن ید باشد. هر مولکول تیروگلبولین حاوی حدود ۷۰ اسیدآمینه تیروزین است و این مولکول سوبسترا های اصلی هستند که به منظور تشکیل هورمون های تیروئیدی باید ترکیب شوند. (شکل۲-۵) بنابراین هورمون های تیروئیدی در داخل مولکول تیروگلبولین تشکیل می شوند. یعنی هورمون های تیروکسین و تری یدوتیرونین تشکیل شده از اسیدهای آمینه تیروزین طی سنتز هورمون های تیروئید و حتی پس از ذخیره هورمون ها در کلوئید فولیکولی به عنوان بخشی از مولکول های تیروگلبولین باقی می مانند. (۱۸)

1-Thyroglobulin



شکل۲-۵: تیروگلبولین

۲-٤-۳-۳- هیدرولیز تیروگلبولین

طی مدت چند دقیقه پس از تحریک غده تیروئید توسط TSH ، cAMP[11] میکرو ویلوس های غشای رأسی سلول به طور قابل توجهی افزایش یافته و تیروگلوبین در این فرایند وابسته به میکروتوبول ها به دام می افتد ؛ که به دنبال پینوسیتوز[12] به داخل سلول فولیکولی باز می گردد. این فاگوزوم ها به لیزوزوم متصل شده و تشکیل فاگولیزوزوم را می دهند که در آنجا آنزیم های پروتئاز و پپتیداز مختلف تیروگلوبین را هیدرولیز کرده و اسیدهای آمینه یدوتیرونین را آزاد می کنند. T_4 ، T_3 احتمالا از طریق یک فرایند تسهیل شده از قسمت قاعده ای

1-Adnocinmonophosphat
2-Pinocytosis

سلول به داخل خون آزاد می شوند. ید موجود در MIT[۱۳] و DIT نیز توسط آنزیم دیدیناز جمع آوری می شود (۱۹).

۲-٤-۳-٤- اکسیداسیون ید

تیروئید تنها بافتی است که می تواند ید را برای ایجاد ظرفیت بالاتر اکسیده کند. اولین مرحله ضروری در تشکیل هورمون های تیروئیدی تبدیل یون های ید به شکل اکسید شده ید یا به صورت ید تازه تشکیل شده یا I^-_3 است. پس از این است که توانایی ترکیب شدن مستقیم با اسید آمینه تیروزین را دارد. این اکسیداسیون ید توسط آنزیم پراکسیداز پیش رفته و پراکسید هیدروژن همراهی کننده اش سیستم نیرومندی را که واجد ید های اکسید کننده است فراهم می کند. پراکسیداز یا در غشای راسی سلول واقع شده یا به آن متصل است، بنابراین درست در همان نقطه ای از سلول که ملکول های تیروگلبولین از دستگاه گلژی و از طریق غشای سلول به داخل کلوئید ذخیره غده تیروئید صادر می شود، ید اکسید شده را فراهم می کنند. وقتی که سیستم پراکسیداز مسدود شده، یا به طور موروثی در سلول وجود نداشته باشد، میزان تشکیل هورمون های تیروئیدی تا حد صفر نزول می کند.(۱۸)

۲-٤-۳-٥- یددار شدن تیروزین و تشکیل هورمون تیروئید

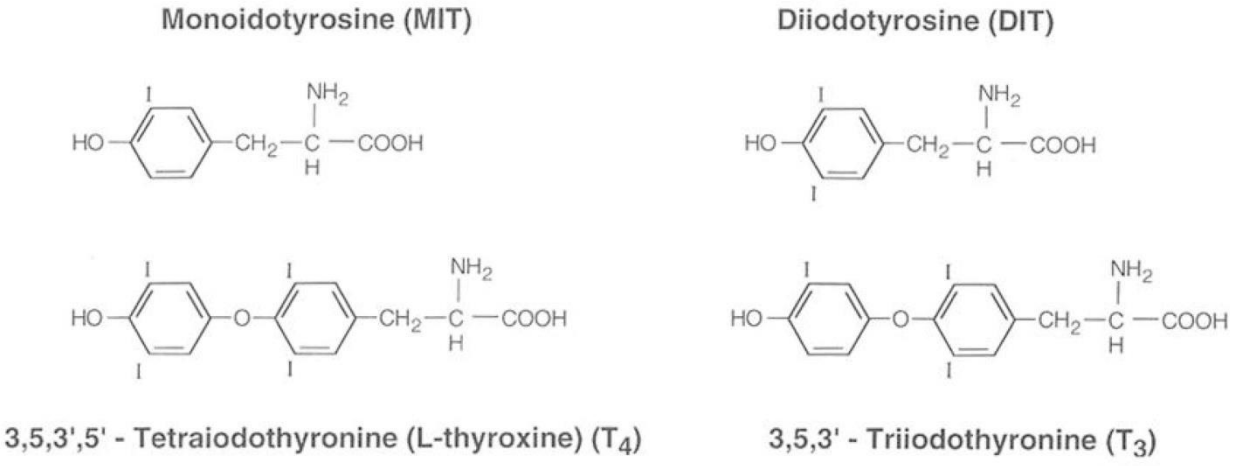
اتصال ید با ملکول تیروگلبولین معدنی شدن تیروگلبولین نامیده می شود. ید اکسید شده حتی به شکل ملکولی به طور مستقیم، ولی به آهستگی به اسیدآمینه تیروزین متصل می شود. ولی در سلول های تیروئید ، ید اکسید شده با آنزیم پراکسیداز تیروئید همراه شده، باعث می شود تا فرایند مذکور طی ثانیه ها یا دقایق رخ دهد. بنابراین تقریباً به همان سرعتی که ملکول تیروگلبولین از دستگاه گلژی آزاد شده، یا از غشای راسی سلولی به

3-Monoiodotyrosine

داخل فولیکول ترشح می شود، ید به حدود یک ششم اسیدهای آمینه تیروزین در داخل ملکول تیروگلبولین متصل می شود. (۲۱)

۲-٤-٤- سنتز T_3وT_4

پروتئین تیروگلوبولین که در فضای وسط فولیکول ذخیره شده بود، با اتصال به ید به واسطه آنزیم تیروئید پراکسیداز سبب تشکیل مونویدوتیروزین یا MIT می گردد. سپس با اتصال یک ید دیگر باعث سنتز دی یدوتیروزین یا DIT می شود که با یکی شدن دو مولکول دی یدوتیروزین با یکدیگر تیروکسین تشکیل می شود. با اینکه یک مولکول منویدوتیروزین با یک مولکول دی یدوتیروزین ترکیب می شود، ولی تری یدوتیروپین(T_3) تشکیل شده نماینده مقداری حدود یک پانزدهم هورمون های نهایی است. (شکل۲-٦) مقادیر کمی T_3معکوس (RT_3) با جفت شدن دی یدوتیرونین با منویدوتیروزین تشکیل می شود، ولی بنظر نمی رسد RT_3 در انسان اهمیت عملکردی داشته باشد.(۲۲)



شکل۲-٦: سنتز T_3، T_4 (۲۲)

۲-٤-٥- هورمون TRH[14]

هورمون آزاد کننده تیروتروپین TRH هورمونی است که از هیپوتالاموس آزاد می شود و موجب ترشح هورمون محرک تیروئید (TSH) از هیپوفیز می شود. تقریبا ۱۵ دقیقه پس از تجویز TRH میزان ترشح TSH به حداکثر خود می رسد. کاهش سطح هورمون های تیروئید سبب افزایش تولید پایه TSH وتشدید اثر تحریکی TRH بر TSH می شود(۲۳).

TSH هم چنین اندازه و تعداد سلول های فولیکولی تیروئید را کنترل می کند. افزایش غلظت هورمون های تیروئیدی باعث یک اثر مهاری بر روی پاسخ هیپوفیز به TRH می شود(۲۳).

۲-٤-٦- سنتز TSH[15]

هورمون TSH که به تیروتروپین معروف است به وسیله سلول‌های غده هیپوفیز قدامی ترشح می‌شود در کنترل عملکرد تیروئید نقش محوری داشته و مفیدترین نشانگر فیزیولوژیک فعالیت هورمون تیروئید است. عامل اصلی تعیین نقطه تنظیم در محور تیروئید هورمون TSH است. ترشح این هورمون به وسیله هورمون هیپوتالاموسی TRH تنظیم می‌شود(۲٤). TRH عمده‌ترین محرک سنتز و ترشح TSH است. تقریباً ۱۵ دقیقه پس از تجویز TRH میزان ترشح TSH به حداکثر خود می‌رسد. کاهش سطح هورمون‌های تیروئید سبب افزایش تولید پایه TSH و تشدید اثر تحریکیTRHبر TSH می‌شود. افزایش سطح هورمون‌های تیروئید نیز به سرعت و به صورت مستقیم TSH را مهار کرده و همچنین اثر تحریکی TRH بر TSH را مهار می‌کنند .این نشان می‌دهد

1-Thyrotropin-Releasing hormone
1-Thyroid stimulating hormone

که هورمون‌های تیروئید عامل اصلی تنظیم کننده تولید TSH هستند. نظیرسایر هورمون‌های هیپوفیزی، TSHبه صورت ضربانی ترشح می‌شود و میزان ترشح آن در ساعات مختلف شبانه‌روز متفاوت است. حداکثر میزان ترشح این هورمون در هنگام شب رخ می‌دهد، چون نوسان هورمون TSH خفیف است یک‌بار اندازه‌گیری آن برای ارزیابی میزان هورمون در گردش خون کافی است.(٦)

آثار اختصاصی TSH بر غده تیروئید :

١) افزایش پروتئولیز تیروتروگلبولین

٢) افزایش فعالیت پمپ یدید

٣) افزایش اندازه و فعالیت افزایش یافته ترشحی سلول های تیروئید

٤) افزایش تعداد سلول های تیروئید(٥)

٢-٤-٧- اعمال فیزیولوژیک هورمون‌های تیروئید

١) هورمون‌های تیروئید، رونویسی از تعداد زیادی از ژن‌ها را افزایش می‌دهند.

٢) هورمون‌های تیروئید، فعالیت متابولیک سلول‌ها را افزایش می‌دهند؛ به این صورت که با افزایش تعداد و فعالیت میتوکندری‌ها و همچنین افزایش انتقال فعال یون‌ها از غشاهای سلولی، باعث افزایش فعالیت متابولیک می‌شوند.

٣) هورمون تیروئید بر روی رشد اثر می‌گذارد؛ هورمون تیروئید در انسان‌ها، عمدتا در رشد کودکان مؤثر است. در کودکان هیپوتیروئید، سرعت رشد تا حدود زیادی کند می‌شود.

٤) هورمون تیروئید، در تکامل مغز نقش دارد؛ یکی از اثرات مهم هورمون تیروئید، پیشبرد رشد مغز و جریان زندگی جنینی و طی دو سه سال اول بعد از تولد است . ترشح هورمون تیروئید در دوره جنینی، باعث بلوغ مغز، هم پیش از تولد و هم بعد از تولد می‌شود(۲۵).

۲-٤-۸- اثرات هورمون تیروئید بر مکانیسم‌های اختصاصی بدن

۲-٤-۸-۱- تحریک متابولیسم کربوهیدرات :

از جمله دریافت سریع گلوکز توسط سلول‌ها، تقویت گلیکولیز، تقویت گلوکونئوژنز، افزایش میزان جذب از دستگاه گوارش و حتی افزایش ترشح انسولین که در نتیجه باعث ایجاد اثرات ثانویه بر متابولیسم کربوهیدرات می‌شود(۲٦).

۲-٤-۸-۲- تحریک متابولیسم چربی:

لیپیدها به سرعت از بافت چربی آزاد می‌شوند و در نتیجه ذخایر چربی بدن بیش از اکثر عناصر دیگر بافتی، کاهش می‌یابد(۲۷).

۲-٤-۸-۳- تأثیر روی چربی‌های پلاسما و کبد:

هورمون تیروئید، غلظت کلسترول، فسفولیپیدها و تری‌گلیسیریدهای پلاسما را کاهش می‌دهد، در حالی که موجب افزایش اسیدهای چرب آزاد می‌شود و بالعکس. افزایش کلسترول تعداد گیرنده‌های LDL را بر روی سلول‌های کبدی افزایش می‌دهد که در نتیجه LDL از پلاسما برداشت می‌شود(۲۸).

۲-٤-۸-٤- افزایش نیاز به ویتامین‌ها:

ویتامین‌ها بخش‌های ضروری برخی از آنزیم‌ها و کوآنزیم‌ها هستند. هورمون تیروئید با افزایش این آنزیم‌ها، نیاز بدن را به ویتامین‌ها افزایش می‌دهد(۲٦).

۲-٤-۸-۵- افزایش متابولیسم پایه:

با توجه به اینکه هورمون تیروئید، متابولیسم تقریبا تمام سلول‌های بدن را افزایش می‌دهد، مقادیر اضافی هورمون می‌تواند گاهی میزان متابولیسم پایه را ٦۰ تا ۱۰۰ درصد افزایش دهد(۲۸-۲٦).

۲-٤-۸-٦- کاهش وزن بدن:

افزایش زیاد هورمون تیروئید، تقریبا همیشه باعث کاهش وزن بدن می‌شود، ولی این اثر همیشه اتفاق نمی‌افتد؛ زیرا هورمون تیروئید اشتها را زیاد می‌کند و این امر ممکن است با تغییر متابولیسم پایه مقابله کند(۲۹).

۲-٤-۹- اثر هورمون تیروئید بر دستگاه قلب و عروق

۱) افزایش جریان خون و برون‌ده قلبی، متعاقب افزایش متابولیسم بافت‌ها

۲) افزایش ضربان قلب به علت تاثیر مستقیم هورمون تیروئید بر تحریک‌پذیری قلب

۳) افزایش قدرت قلب، متعاقب افزایش فعالیت آنزیمی ناشی از ترشح هورمون تیروئید

٤) افزایش سرعت و عمق تنفس: به علت افزایش متابولیسم، مصرف اکسیژن و تولید دی‌اکسیدکربن نیز افزایش می‌یابد(۲۹-۳۰).

۲-٤-۱۰- افزایش حرکات گوارشی:

این امر که متعاقب افزایش اشتها و مهمتر از همه ترشح شیره‌های هضمی به وجود می‌آید، از اثرات هورمون تیروئید می‌باشد(۳۱-۳۲)

۲-٤-۱۱- اثرات تحریکی بر دستگاه اعصاب مرکزی:

هورمون تیروئید، سرعت تفکر را بالا می‌برد، ولی گاهی باعث از هم گسیختگی آن نیز می‌شود؛ بر عکس، فقدان هورمون تیروئید، این عمل را کاهش می‌دهد. شخص هایپرتیروئید ممکن است بیش از حد عصبی باشد و گرایش‌های روانی عصبی مثل کمپلکس‌های اضطرابی، نگرانی شدید و بدبینی از خود نشان دهد(۳۰-۳۱).

۲-٤-۱۲- اثر بر عملکرد عضلات:

با افزایش مختصر هورمون تیروئید، عضلات توانمند می‌شود ولی بیش از آن، باعث کاتابولیسم اضافی پروتئین در عضلات گشته و ضعیف می‌شوند(۲٦).

۲-٤-۱۳- لرزش عضلانی:

این لرزش(tremor) خفیف، ناشی از قابلیت واکنش سیناپس‌های عصبی در نواحی نخاعی کنترل‌کننده تونوس عضلات است(۲٦).

۲-٤-۱٤- اثر بر روی خواب:

به علت اثرات تحریکی هورمون تیروئید بر سیناپس‌ها، علیرغم خستگی، فرد هایپرتیروئید، به دشواری به خواب می‌رود(۲٦).

۲-٤-۱۵- اثر هورمون تیروئید بر عملکرد جنسی:

در مردان، کمبود هورمون تیروئید موجب کاهش میل جنسی می‌شود؛ متقابلا، گاهی افزایش زیاد هورمون تیروئید باعث ناتوانی جنسی می‌شود. در زنان، کمبود هورمون تیروئید، گاهی سبب منوراژی(خون‌ریزی زیاد قاعدگی) و پلی‌منوره(افزایش دفعات قاعدگی) می‌شود(۲٦-۳۰).

۲-٤-١٦- اثرات بیولوژیک

هورمونهای تیروئیدی باعث افزایش سرعت متابولیسم پایه و افزایش دمای بدن، افزایش سنتز پروتئینها، افزایش حساسیت و پاسخ بدن به کاتکول آمینها مانند آدرنالین شده و برای تکامل و رشد سلولها و اعضای بدن نیز به ویژه در دوران جنینی و کودکی لازم وضروری هستند(۳۵). همچنین این هورمونها متابولیسم پروتئینها، قند و چربی و همچنین متابولیسم ویتامینها را در بدن کنترل و تنظیم میکند و سلول را در جهت استفاده صحیح از منابع انرژی هدایت میکند .هورمون های تیروئید در حیوانات دارای اثرات بیشتری نسبت به انسان میباشد و باعث تنظیم الگوی خواب زمستانی پستانداران و همچنین الگوی پوست اندازی در پرندگان می شود(۳٦). بارزترین شکل این امر در فرآیند دگردیسی دوزیستان دیده می شود. این اثرات احتمالا از طریق تنظیم بیان ژن های خاص اعمال می شوند.(۱)

۲-٤-۱۷- بیماری های تیروئید

۱) کم کاری تیروئید (هایپوتیروئیدی[۱٦])
۲) پرکاری تیروئید (هایپرتیروئیدی[۱۷])
۳) بزرگی غده ی تیروئید (گواتر)
٤) توده های تیروئید
٥) سرطان تیروئید
٦) التهاب تیروئید(۳۷-۳۸)

۲-٤-۱۷-۱- کم کاری تیروئید

1-Hypothyroidism
2-hyperthyroidism

وقتی غده ی تیروئید کمتر از حد طبیعی فعالیت کند، یا از بدو تولد ناقص شکل گرفته باشد، یا به وسیله جراحی کل تیروئید یا قسمتی از آن برداشته شده باشد، و یا ید کافی در رژیم غذایی موجود نباشد دیگر نمی‌تواند هورمون کافی تولید کند و به این حالت کم کاری تیروئید گفته می‌شود(۳۹). یکی از شایعترین علل کم کاری تیروئید یک بیماری خود ایمنی است که به آن بیماری هاشیموتو [۱۸]گفته می‌شود. در این بیماری به تدریج پادتن‌هایی بر علیه تیروئید ساخته می‌شود که تیروئید را تخریب می‌کند و توانایی تولید هورمون را از بین می‌برد(٤٠).

۲-٤-۱۷-۲- پرکاری تیروئید

وقتی تیروئید بیش از اندازه فعالیت کند و هورمون زیادی تولید کند گفته می‌شود که فرد مبتلا به پرکاری تیروئید می‌باشد. شایعترین علت پرکاری تیروئید یک بیماری خود ایمنی به نام بیماری گریوز [۱۹]است که در آن بر علیه تیروئید پادتن ساخته می‌شود که موجب می‌شود سرعت تولید هورمون افزایش یابد(٤١).

۲-٤-۱۷-۳- بیماری خود ایمنی تیروئید

بیشتر اختلالات تیروئید مانند پرکاری یا کم کاری تیروئید مربوط به بیماریهای خود ایمنی است. در بیماری خود ایمنی شرایطی ایجاد می‌شود که بدن توانایی خود در تشخیص بین بافتهای بدن با باکتریها، ویروسها و سایر عوامل بیماری زا را از دست می‌دهد(٤٢).

به همین دلیل سیستم ایمنی بر علیه این بافتها پادتن می‌سازد و اشتباهاً به این بافتها حمله می‌کند. در این بیماریها پادتنی که علیه تیروئید ساخته می‌شود موجب تخریب تدریجی تیروئید می‌شود و کم کاری تیروئید ایجاد می‌کند و یا موجب می‌شود تا بیش از حد فعال شود و پرکاری تیروئید ایجاد شود(٤٣).

1-Hashimoto diseas
2-Graves

۲-٤-۱۷-٤-گواتر و توده های تیروئید

برخی اوقات غده ی تیروئید بزرگ می‌شود. ممکن است این حالت در اثر بیماری هاشیموتو، گریوز، یا در اثر کمبود ید یا عدم تعادل هورمونهای تیروئید ایجاد شود. به بزرگی تیروئید گواتر گفته می‌شود(٤٤).

۲-٤-۱۷-۵- التهاب تیروئید

ممکن است غده ی تیروئید در اثر تاثیر باکتریها یا ویروسها ملتهب شود و تیروئیدیت ایجاد شود.علایم آن شامل تب و دردناکی غده می باشد. علایم پرکاری تیروئید ممکن است وجود داشته باشند اگرچه وضعیت تیروئید بستگی به مرحله التهاب دارد(٤٥).

چون میزان اتصال هورمون به پروتئین ها و همچنین مقدار پروتئین های حامل به عوامل متعددی وابسته است و از طرفی هورمون های آزاد از نظر بیولوژیکی مهم اند، اندازه گیری هورمون های آزاد در ارزیابی تیروئید مفیدتر می باشند(٤٦).

۲-٤-۱۸- تیروئید و تشخیص آن

غده تیروئید پروانه ای شکل بوده و در قسمت عرضی حنجره در جلوی گلو قرار دارد(٤٧). در پرکاری تیروئید (Hyperthyroidism)، [۲۰]بیش از مقدار طبیعی، هورمون تیروکسین ترشح می شود و در این حالت علائمی از بیماری از جمله تپش تند قلب، کاهش وزن، تعریق، عدم تحمل گرما، لرزش و بیقراری نمایان می شود. هیپو تیروئیدی (Hypothyroidism)[۲۱]یا کم‌کاری غده تیروئید در بین بیماری‌های غدد درون ریز

1-Hyperthyroidism

۱-hypothyroidism

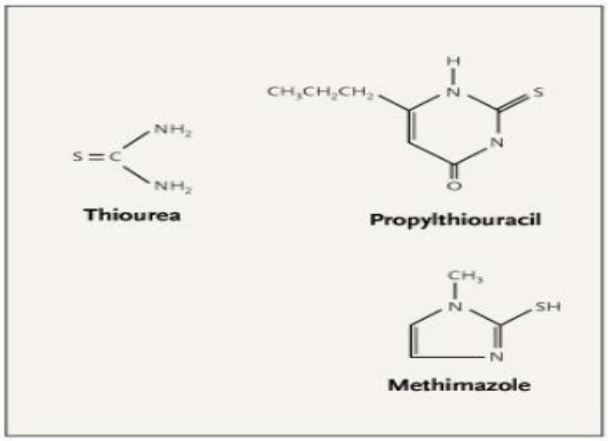
شایع‌ترین بیماری پس از دیابت است(٤٨). این بیماری هنگامی ایجاد می‌شود که غده تیروئید نتواند به اندازه نیاز بدن هورمون غده تیروئید یعنی تری یدوتیرونین و تیروکسین را تولید کند. این هورمونها وظیفه تنظیم مصرف انرژی، تولید گرما و تسهیل رشد در بدن را برعهده دارند(٤٩). این بیماری در زنان سه برابر شایع‌تر از مردان است. ضعف و خستگی، خواب‌آلودگی، پوست خشک، عدم تحمل به سرما، کاهش تعریق، زبان بزرگ، ورم صورت، فراموشکاری، یبوست، افزایش وزن، اختلالات قاعدگی، سقط های مکرر، تاخیر در رفلکس ها، کم‌خونی ، درد مفاصل و عضلات از جمله علائم این بیماری است که در بزرگسالان سیر کند و تدریجی دارد(٥٠). گاهی هم پر کاری و کم کاری تیروئید ممکن است بدون علامت هم باشد و در خانم ها موجب ناباروری می شود.(١٨).

٢-٤-١٩- مواد ضد تیروئیدی

داروهای آنتی تیروئیدی که برای بیش از نیم قرن مورد استفاده قرار گرفته اند، اصلی ترین مواد در زمینه ی کنترل و درمان پرکاری تیروئید می باشند. داروهای آنتی تیروئیدی، مولکول های نسبتا ساده ای تحت عنوان تیو نامیدها بوده که حاوی یک گروه سولفیدریل و یک بخش تیوره درون یک ساختار هتروسیکلیک می‌باشند. تیونامیدها از پروپیل تیویوراسیل (PTU)، متی مازول[٢٢] (MMI) و کربی مازول (CMZ) تشکیل یافته اند (شکل ٢-٧) متی مازول نسبت به پروپیل تیویوراسیل دارای نقش بهبودی سریع تری در غلظت‌های سرمی تیروکسین و تری یدو تیر ونین می باشد، ضمن اینکه اثرات جانبی متی مازول معمولاً کمتر از پروپیل تیویوراسیل است. اثر اولیه ی این داروها، مهار کردن سنتز هورمون های تیروئید از طریق مداخله با ید دار شدن باقیمانده های تیروزین در تیروگلوبولین (کاتالیز شده توسط پراکسیداز) می باشد که قدمی مهم در سنتز

22 Methimazole = MethylMercaptoImidazole

تیروکسین (T_4) و تری یدو تایرونین (T_3) است. این داروها ید دار شدن ریشه های تیروزیل تیروگلوبولین را کاهش می دهند. در واقع، این داروها مقدار سطوح هورمونی T_3 و T_4 را در خون کاهش می دهند(۵۱). به عبارتی دیگر، اثر تیو نامیدها از طریق وقفه ی عمل پراکسیداز تیروئیدی و مهار واکنشهای کاتالیز شده توسط این آنزیم، جلوگیری از جفت شدن ید با تیروزین و مهار تشکیل منویدو تیروزین MIT و دی یدو تیروزین DIT، همچنین جلوگیری از پیوند MIT و DIT به یکدیگر ممکن است اعمال شود (۲).



شکل ۲-۷: نمایی از ساختارهای شیمیایی PTU, MMI در قیاس با تیوره(۲)

۲-۵-مروری بر تحقیقات انجام شده

عادلی و همکاران(۲۰۱۹) پژوهشی تحت عنوان اثر کم کاری تیروئید القا شده با مصرف متی مازول بر میزان باروری در موش ماده صورت پذیرفت که نتایج نشان داد؛ در گروه کنترل از هر ده موش ماده ۹ موش، در گروه دوز پائین ۸ موش و گروه دوز بالای دارو ٤ موش زایمان موفق داشتند؛ و گروه با دوز بالای دارو کاهش معنی -داری نسبت به گروه کنترل نشان داد تعداد نوزادان در هر بار زایمان موفق در هر دو گروه آزمایشی (دوز پایین ۰۳/۰، دوز بالا ۰٤۲/۰) نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری را نشان دادند این مطالعه پیشنهاد می کند که؛

کاهش هورمون تیروئیدی بعد از لانه گزینی نیز می -تواند بر ادامه باروری و زایمان موفق اثر داشته باشد و باعث کاهش تعداد زاده- ها و افزایش سقط جنین گردد(۵۲).

سارا حبیب پور و همکاران(۲۰۱۵)، در پژوهشی به تاثیر عصاره ی آبی الکلی برگ گردو بر شاخص های هماتولوژیک در موض صحرایی نر مبتلا به کم کاری تیروئید پرداختند. آنها نشان داده اند که در رات های مواجه شده با متی مازول تعداد گلبول های قرمز، هموگلوبین، پلاکت، لنفوسیت،MCH ، MCHC نسبت به گروه کنترل و شاهد کاهش و ائوزینوفیل افزایش معنی دار نشان داده است. اما در گروه های استرسی با متی مازول که عصاره ی برگ گردو را بصورت خوراکی به مدت ٤هفته دریافت داشته اند میزان گلبول های قرمز، هموگلوبین و پلاکت افزایش اما ائوزینوفیل کاهش معنی داری نشان داده است(۵۳).

هاشمی و همکاران (۲۰۱۵) در پژوهشی به بررسی تاثیر فلوکستین بر میزان هورمونهای تیروئیدی و کورتیزل در موشهای صحرایی پرداختند.آنها در این پژوهش اعلام داشتند که فلوکستین با تاثیر بر فعالیت سطوح مختلف محور هیپوتالاموس – هیپوفیز –آدرنال، میزان ترشح هورمون کورتیزول را کاهش می دهد. هم چنین باعث کاهش فعالیت غده تیروئید شده که احتمالا ناشی از افزایش ترشح پرولاکتین توسط این دارو و از این طریق مهار ترشح هورمون آزاد کننده تیروتروپین و کاهش تولید تیروتروپین و هورمون های تیروئیدی شده است(٥٤).

محمدی (۲۰۱٤)در پژوهشی با عنوان تأثیر عصاره هیدروالکلی برگ گردو بر تغییرات بافتی پانکراس در موش صحرایی دیابتی شده و نرمال گزارش دادند که ، عصاره هیدروالکلی برگ گردو در برگشت عملکرد سلولهای β و بهبود جزایر لانگرهانس مؤثر است(۵۵).

یوسف وند،(۲۰۱۳)، پژوهشی تحت عنوان اثر کم کاری تیروئید القاء شده با متی مازول بر میزان عناصر کمیاب مس و روی در سرم موش های سفید صحرایی در دانشگاه دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه صورت پذیرفت، نتایج پژوهش بیان شده است، کم کاری تیروئید القاء شده با متی مازول، موجب کاهش معنی دار سطح هورمون های تیروکسین، تری یدوتیرونین و عناصر روی و مس سرم، کاهش وزن بدن و افزایش وزن غده تیروئید در گروههای تیمار نسبت به گروه کنترل شد که این اثرات در گروه تیمار با دوز بالا، نمایان تر بود، همچنین این پژوهش پیشنهاد میکند که کمکاری تیروئید القاء شده با متی مازول، ضمن کاهش میزان هورمون های تیروئیدی و افزایش وزن غده تیروئید و کاهش وزن بدن، سبب کاهش معنی دار وابسته به دوز در میزان عناصر مس و روی سرم خون میگردد. گمان می رود کم کاری تیروئید برخی از اثرات خود را بر بدن، از طریق کاهش سطح عناصر مس و روی اعمال میکند(٥٦)

محمدی زاده،(۲۰۱۱)، پژوهشی تحت عنوان اثر کمکاری تیروئید القاء شده با متی مازول بر میزان هورمون لوتئینی، تستوسترون، وزن بیضه و غده تیروئید در موش سفید صحرایی صورت پذیرفته، نتایج پژوهش بیان داشته، استفاده از متی مازول، سبب کاهش معنی دار سطح هورمونهای تستوسترون، هورمونلوتئینی سرم و نیز کاهش وزن بیضه و افزایش وزن غده تیروئید در گروههای متی مازول نسبت به گروه کنترل شد که این اثرات در گروه دوز بالا، بیشتر بود(۵۷).

اخی،(۲۰۰۹)، پژوهشی تحت عنوان بررسی اثر لووتیروکسین بر عملکرد تنفسی بیماران مبتلا به کم کاری آشکار تیروئید صورت پذیرفته، نتایج پژوهش بیان داشته، درمان هیپوتیروئیدی با لووتیروکسین می تواند اثرات بسیار خوبی بر عملکرد ریوی و معیارهای اندازه گیری شده در اسپیرومتری داشته باشد(۵۸).

مانیشا و همکاران(۲۰۱۸)، به مطالعه ای تاثیر عناصر کمیاب مس و روی در بیماران با کم کاری تیروئید پرداختند. آنها نشان داده اند که در بیماران با کم کاری تیروئید غلظت عناصر مس و روی کاهش فوق العاده ای پیدا می کنند. از این رو رژیم غذایی غنی از این عناصر کمیاب باید به این گونه بیماران تجویز شود تا عملکرد هورمون های تیروئیدی دچار اختلال در آسیب نشود(۵۹).

استوبر و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند اثر عصاره ی هیدروالکلی گیاه مریم گلی بر سطح سرمی هورمون های تیروئیدی در موش های صحرایی نر باعث غلظت پلاسمایی T3 & T٤ و TSHدر گروه های هیپوتیروئیدی دریافت کننـده عـصاره می شود.

فصل سوم: روش انجام پژوهش

مقدمه

در فصل حاضر نحوه انجام پژوهش و جمع‌آوری اطلاعات بیان می‌شود. موضوعات مورد بحث در این فصل عبارتند از: طـرح تحقیـق، مشخصات آزمودنی‌ها، محیط پژوهش ، ابـزارهای اندازه‌گیری، متغیرهای تحقیق استفاده شده در تحقیق، روش های اندازه گیری متغیرهای پژوهش و در پایان تجزیه و تحلیل آزمایشگاهی و روش آماری.

۳-۱- مواد ،وسایل و دستگاههایی که طی انجام تحقیق مورداستفاده قرار گرفتند:

۳-۱-۱- مواد مصرفی و ترکیبات شیمیایی

- آب مقطر
- الکل سفید۹۶ درصد
- مقداری پودر گردو
- DMSO (دی سولفوکساید)
- کیت T3
- کیت T4
- کیت TSH
- برچسب کاغذی
- دستکش یک بار مصرف
- غذای فشرده شده مخصوص
- خاک اره

۳-۱-۲- وسایل، لوازم و دستگاههای غیر مصرفی

- ارلن

- لوله آزمایش

- دستگاه تهویه

- دماسنج

- قفس نگهداری موش از جنس پلی کربنات با سقف مشبک

- ظرف آبخوری مخصوص موش

- دستگاه سانتریفوژ

- جالوله ای

- ترازو

- جار شیشه ای مخصوص بیهوش کردن موش

- دستگاه عصاره گیر

- دستگاه حمام آب گرم

- دستگاه آون

۳-۲-روش تهیه عصاره گردو

جهت تهیه عصاره ی هیدرو الکلی گردوی سیاه ، ابتدا مقداری (حدود ۱ کیلوگرم) از گردوی سیاه پس از خریداری از سوپر مارکت های سطح شهر ساری و نکا به کمک آسیاب برقی پودر می شود. سپس پودر گردوی سیاه با الکل اتانول ۹۶٪ و آب مقطر به نسبت ۵۰/۵۰ به مدت ۷۲ ساعت خیسانده و ورتکس می شود

سپس آن را صاف نموده عصاره هیدرو الکلی به دست آمده را در لوله های آزمایش ریخته و با سرعت ۵۰۰۰RPM به مدت ۱۰ دقیقه و به کمک دستگاه سانتریفیوژ ، سانتریفیوژ می شود. سپس مایع رویی حاصل از سانترفیوژ باهم ادغام شده و در آون ٤٠ درجه سانتی گراد قرار داده شده تا ماده ی غلیظی به دست آید این ترکیبات می تواند در یخچال نگهداری شده تا جهت تجویزبه حیوانات مورد استفاده قرار گیرد.(٦١)

۲-۲- حیوانات مورد استفاده و نحوه نگهداری آنها

حیوانات مورد استفاده در این تحقیق ۳۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار در در محدوده ی وزنی ۲۰ ±۲۰۰ گرم و محدوده ی سنی ۲/۵ تا ۳ ماه بوده است. این حیوانات که از انستیتو پاستور آمل تهیه شده و کلیه آزمایشات اعم از تجویز و تزریق در همان محل انجام می گردد. درجه حرارت محیط ۲ ± ۲۳ در طول شبانه روز ثابت ، دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بوده است.

آب و غذای فشرده مخصوص در تمام طول دوره تحقیق بدون محدودیت در اختیار موش ها قرار داده شده است. موش ها در قفس هایی از جنس پلی کربنات با اندازه ٤٠×٢٥×١٥ و با سقف مشبک که از جنس استیل است نگهداری شدند، به طوری که در هر قفس تعداد ٦ سر موش نگهداری می شد. در کف قفس ها مقداری خاک اره ریخته می شد و کف قفس ها هر سه روز تعویض و قفس ها هفته ای یکبار ضد عفونی می شد. (شکل۳-۱)

شکل۳-۱: جایگاه نگهداری حیوانات

۳-۳- گروه بندی حیوانات

تعداد کل موش های مورد استفاده در این تحقیق ۳۰ سر بوده که در ابتدا این موش ها وزن کشی شده و بر اساس محدوده وزنی در ٤ گروه جداگانه قرار داده شدند.(شکل۳-۲)

شکل۳-۲:روش وزن کشی حیوانات مورد آزمایش

موش ها به صورت زیر تقسیم بندی شدند:

جدول۳-۱: گروه بندی و گاواژ موش ها

	تاریخ آغاز هفته تاریخ آغاز هفته	۶/۱۷ ۶/۱۹	۶/۲۲ ۶/۲۶	۶/۲۹ ۷/۰۲	۷/۰۵ ۷/۰۹	۷/۱۲ ۷/۱۶	۷/۱۹ ۷/۲۳	۷/۲۶ ۷/۳۰	۸/۰۳ ۸/۰۷	
گروه اول	گروه Con (Control)									فقط آب و غذا
گروه دوم*	گروه CS (Control-Stress)	○هفته۲ ○هفته۳ ○هفته۴			○هفته۱ ○هفته۲ ○هفته۳ ○هفته۴	○هفته۱ ○هفته۲ ○هفته۳ ○هفته۴				گاواژ متی مازول(فقط سه روز اول) 25 mg/Kg.BW
گروه سوم	گروهCW (Control-Walnut)			○هفته۱ ○هفته۲ ○هفته۳ ○هفته۴	○هفته۱ ○هفته۲ ○هفته۳ ○هفته۴	○هفته۱ ○هفته۲ ○هفته۳ ○هفته۴	○هفته۱ ○هفته۲ ○هفته۳ ○هفته۴	○هفته۱ ○هفته۲ ○هفته۳ ○هفته۴	○هفته۱ ○هفته۲ ○هفته۳	گاواژ عصاره گردو (فقط ۶هفته آخر) 1000 mg/Kg.BW
گروه چهارم*	گروه SW (Stress -Walnut)	○هفته۲ ○هفته۳ ○هفته۴		○هفته۱ ○هفته۲ ○هفته۳ ○هفته۴	○هفته۱ ○هفته۲ ○هفته۳ ○هفته۴	○هفته۱ ○هفته۲ ○هفته۳ ○هفته۴	○هفته۱ ○هفته۲ ○هفته۳ ○هفته۴	○هفته۱ ○هفته۲ ○هفته۳ ○هفته۴	○هفته۱ ○هفته۲ ○هفته۳ ○هفته۴	گاواژ متی مازول(فقط سه روز اول) 25 mg/Kg.BW گاواژ عصاره گردو (فقط ۶هفته آخر) 1000 mg/Kg.BW
گروه پنجم*	گروه SL (Stress-Levothyroxine)	○هفته۲ ○هفته۳ ○هفته۴		○هفته۱ ○هفته۲ ○هفته۳ ○هفته۴	○هفته۱ ○هفته۲ ○هفته۳ ○هفته۴	○هفته۱ ○هفته۲ ○هفته۳ ○هفته۴	○هفته۱ ○هفته۲ ○هفته۳ ○هفته۴	○هفته۱ ○هفته۲ ○هفته۳ ○هفته۴	○هفته۱ ○هفته۲ ○هفته۳ ○هفته۴	گاواژ متی مازول(فقط سه روز اول) 25 mg/Kg.BW گاواژ لوتیروکسین (فقط ۶هفته آخر) 1.6 µg/Kg.BW

۳-۳- ۱- روش تجویز دارو

در این مرحله عصاره گردو را در DMSO[۲۳] حل کرده و غلظت های مناسب تهیه شد. انتخاب غلظت های مناسب با توجه به سمیت خوراکی عصاره گردو در موش صحرایی،صورت پذیرفت.(٦٤)

DMSO یا دی سولفوکساید یک حلال آپروتیک قطبی است که دارای پیوند دوگانه گوگرد-اکسیژن می باشد. ویژگی خاص این ترکیب در حل کردن بسیاری از ترکیبات قطبی و غیر قطبی و قابلیت اختلاط پذیری آن با آب و مایعات فیزیولوژیک است.(٦٢)

1-Dimethyl sulfoxide

برای خوراندن عصاره به حیوانات از نیدل مخصوص که به صورت پلاستیک با انتهای گرد یا ساده به فرم انحنا دار می باشد استفاده شد. حجم معینی از عصاره با مقادیر ۱۰۰۰ میلی گرم را بر داشته و حیوان را از پوست ناحیه پشت گردن طوری نگه می داریم که حرکات آن به حداقل برسد.سپس پوست ناحیه سر را کمی به عقب کشیده تا دهان باز شود و راه مری کاملاً باز بماند. سپس عصاره به کمک سرنگ مجهز به نیدل گاواژ وارد دهان حیوان می شود. نیدل باید به آسانی وارد مری گردد و دقت شود تا عصاره کاملاً بلعیده شود و از دهان خارج نگردد. از همین روش برای تجویز آب مقطر به گروه شاهد استفاده می شود. در این تحقیق مدت زمان خوراندن آب مقطر و عصاره گردو ٤٢ روز در نظر گرفته شد که به صورت روزانه بین ساعات ۹-۸ صبح صورت گرفت.

تجویز دارو به صورت دهانی در ساعت معین و ثابتی از روز انجام گردید.از تمام حیوانات در پایان ٤٢ روز به وسیله بیهوشی خفیف (اتر) خونگیری از ناحیه بطن انجام شد . (شکل۳-۳)

به منظور بررسی تاثیر احتمالی عصاره گردو بر وزن حیوانات مورد آزمایش قبل از تزریق عصاره و بعد از پایان دوره آزمایش همه نمونه ها توزین شده و مشخصات وزنی آنها یادداشت گردید.

شکل۳-۳: روش تجویز دارو

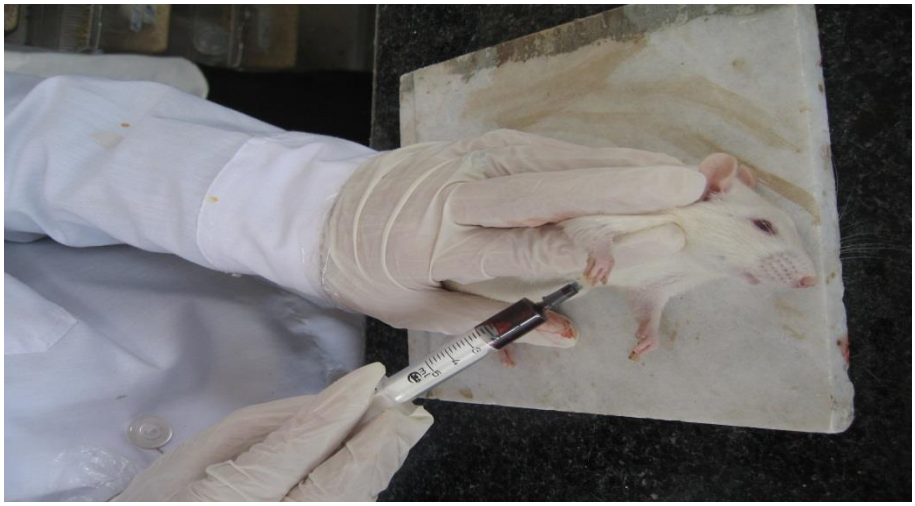
۳-۳-۲-روش بیهوش کردن حیوانات وخون گیری

۳-۳-۲-۱- بیهوش کردن حیوانات

یک شبانه روز پس از آخرین تجویز عصاره، حیوانات را درون ظرف مخصوص بیهوشی (جار) قرار داده به کمک پنبه آغشته به اتر و به روش استنشاقی بیهوش کرده، بدین صورت که حیوانات مورد نظر را یکی یکی در حدود یک تا دو دقیقه در آن قرار داده و زمانیکه علائم بیهوشی خفیف در حیوان مشاهده گردید، حیوان را از محفظه مخصوص خارج ساخته و روی میز تشریح قرار داده شد. در این هنگام تعداد ضربان قلب و تنفس موش های صحرایی در هر دقیقه کاهش محسوسی می یابد و از این طریق می توان از بیهوشی کامل حیوان اطمینان حاصل کرد. دلیل انتخاب اتر برای بیهوشی این است که بیهوشی با اتر خفیف است و تاثیر کمتری بر سرعت جریان خون دارد و این نکته در عمل خون گیری اهمیت فراوانی دارد.

۳-۳-۲-۲-خون گیری

پس از بیهوشی حیوان را به پشت روی دستگاه مخصوص تشریح ثابت کرده ،در ابتدا با انگشت قفسه سینه حیوان را لمس می کنیم تا محل بیشترین ضربان قلب را بیابیم، سوزن انسولین را در ناحیه ای که قله ضربات است وارد می کنیم، تپش قلب را در سرنگ به صورت لرزش واضحی حس خواهیم کرد. در این زمان می توانیم خونگیری را کامل کنیم، سپس بلافاصله این خون به درون لوله آزمایش (فاقد هر گونه مواد انعقادی) جهت تهیه سرم ریخته شد.(شکل۳-٤)



شکل۳-٤: روش خونگیری از موش

۳-۳-۳-۳-روش تهیه سرم و نگهداری آن

پس از خون گیری، نمونه های خون لخته شده با دورRPM [۲٤]۲۵۰۰ و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید.سرم حاصل با استفاده از پیپت پاستور جدا و درون لوله های یک بار مصرف آزمایشگاهی ریخته و پس از زدن بر چسب روی هر لوله و نوشتن مشخصات لازم درب آن را به وسیله پارافیلم بسته و تا زمان سنجش هورمون ها در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

و در نهایت سطح سرمی هورمونهای تیروئیدی اعم از TSH-T4-T3 و Anti-Tpo با کیت های اختصاصی و به روش الایزا تعیین و مقایسه می شود(٦۰).

ارزیابی پارامترهای لیپیدی خون (LDL ،Chol-Total)

ارزیابی کلسترول به روش آنزیمی

1-Revolutions Per Minute
2-Fixation
3-Dehydration

آنزیم کلسترول استراز روی استرهای کلسترول اثر کرده و آنرا به کلسترول آزاد و اسیدهای چرب تبدیل می کند. کلسترول اکسیداز کلسترول را به کلستن ۳ اون و آب اکسیژنه اکسید نموده و سپس آب اکسیژنه در مجاورت فنل و ٤ آمینو آنتی پیرین به کینون قرمز تبدیل می شود.رنگ حاصل متناسب با غلظت کلسترول می باشد.

استر کلسترول + H_2O $\xrightarrow{\text{کلسترول استراز}}$ **Cholestrol + Fatty acid**

کلسترول + O_2 $\xrightarrow{\text{کلسترول اکسیداز}}$ ٤-کلستن-۳-اون + H_2O_2

$2H_2O_2$ + Phenol + ٤ آمینو آنتی پیرین $\xrightarrow{\text{پراکسیداز}}$ کینون قرمز $4H_2O$

کینون قرمز رنگ که رنگ حاصل متناسب با غلظت کلسترول است.

معرف های مورد نیاز:

معرف ۱

تامپون پایپز(pH=6/9)	۵۰ml
فنل	۲٤ ml
سدیم	۰/۵ml

معرف ۲

کلسترول استراز	۲۰۰ Iu/l
کلسترول اکسیداز	۲۵۰ Iu/l
پراکسیداز	۱۰۰۰ Iu/l

٤-آمینو آنتی پیرین ۰/۵mmol/l

معرف۳

استاندارد ۲۰۰mg/dl

تهیه محلول آماده به کار:

معرف ۲ را در معرف ۱ حل کنید این محلول در دمای ۲۵-۲۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ هفته و در دمای ۸-٤ درجه سانتی گراد به مدت ٤ هفته پایدار است.

روش انجام آزمایش

	T(تست)	S(استاندارد)	B(بلانک)
نمونه سرم	20µl	-	-
استاندارد	-	20µl	-
آب مقطر	-	-	20µl
محلول آماده به کار	2ml	2ml	2ml

بعد از انجام مراحل فوق، لوله ها را مخلوط نموده و جذب نمونه های تست و استاندارد را پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد(انکوباتور یا بن ماری) به کمک اسپکتوفتومتر در مقابل بلانک در طول موج ۵۰۰ نانومتر قرائت می شود(٦۳).

روش محاسبه

غلظت کلسترول در نمونه سرم= $\frac{OD\ T}{OD\ S}$ * cons- std(200 mg/dl)

غلظت استاندارد کلسترول

محدوده مرجع:

سرم یا پلاسما	150-260 mg/dl	(3.87-6.71 mmol/L)

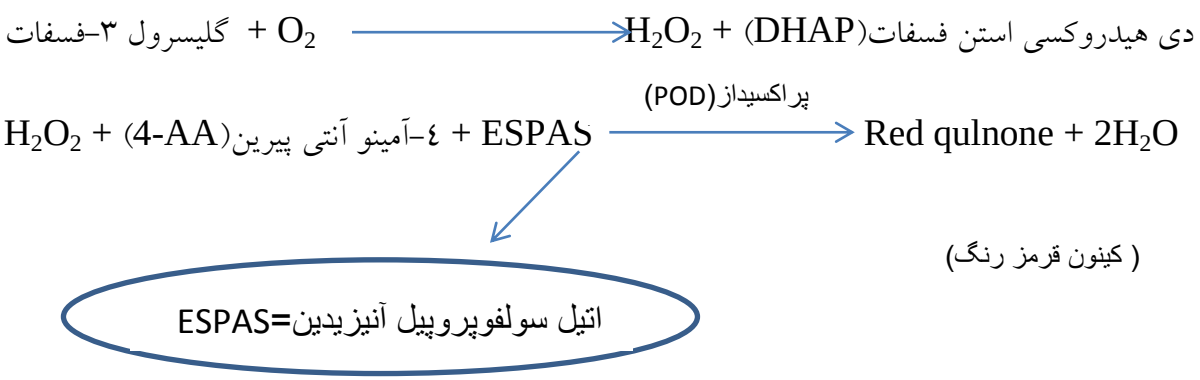
شکل۳-۱: دستگاه اسپکتوفتومتر-UV۱۸۰۰ (تصویر نگارنده)

ارزیابی TG

اصول اندازه گیری تری گلیسیرید ها طبق زیست شیمی بر مبنای هیدرولیز تری گلیسیرید ها توسط آنزیم لیپوپروتئین لیپاز و اندازه گیری گلیسرول آزاد شده به روش کلریمتریک طبق واکنش های زیر می باشد:

تری کلسیرید + H_2O $\xrightarrow{\text{لیپو پروتئین لیپاز(LPL)}}$ گلیسرول + F.A

گلیسرول + ATP $\xrightarrow[\text{گلیسرول ۳-فسفات اکسیداز(GPO)}]{\text{گلیسرول کیناز(GK)}}$ گلیسرول۳-فسفات + ADP



رنگ حاصل متناسب با غلظت تری گلیسرید می باشد

محدوده مرجع:

سرم یا پلاسما	در مردان	(0.68-1.88 mmol/l) 60-165 mg/dl
	در زنان	(0.46-1.6 mol/l) 40-140 mg/dl

معرف ها:

معرف۱ :

بافر پایپز	550 mmol/l
	1 mmol/l

معرف۲:

لیپاز	1100 Iu/l
گلیسروکیناز	800 Iu/l
گلیسرو-۳-فسفات اکسیداز	3000 Iu/l
پراکسیداز	350 Iu/l

٤-آمینو آنتی پیرین 0.7 mmol /l

30 mmol/l

معرف ۳:

استاندارد (2.28 mmol/l) 200 mg/dl

تهیه محلول مورد استفاده

معرف ۲ را در معرف ۱ حل کنید. ایم محلول به مدت ۳ روز در دمای ۲۵-۳۰ درجه سانتی گراد و ۲ هفته در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد پایدار است.

روش انجام آزمایش

	بلانک(B)	استاندارد(S)	نمونه(T)
محلول تهیه شده	2ml	2ml	2ml
آب مقطر	20µl	–	-
استاندارد	-	20µl	–
نمونه	–	–	20µl

سپس لوله ها را مخلوط نموده و جذب نوری نمونه های تست و استاندارد پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در مقابل بلانک در طول موج ۲۵۰nm قرائت می شود(٦۳).

محاسبه

غلظت تری گلیسرید در نمونه سرم= $\frac{OD\ T}{\text{OD S}}$ * cons- std(200 mg/dl)

ارزیابی HDL

جهت ارزیابی HDL لازم است شیلومیکرون، VLDL و LDL ابتدا در سرم حذف و پاکسازی شود. جهت این آزمایش، پس از عمل سانتریفیوژ و رسوبVLDL ، LDL و شیلومیکرون، از محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ جهت ارزیابی HDL استفاده شود.

ابتدا ۵۰ µl محلول رسوب دهنده را در یک لوله آزمایش حاوی ۵۰۰ µl سرم ریخته و سپس لوله آزمایش را مخلوط می نماییم(به کمک Mixer). لوله آزمایش را به مدت ۱۰ min در محیط آزمایشگاه(RT) قرار داده تا انکوبه شودو سپس در دور ۳۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ می کنیم. در نهایت با استفاده از محلول رویی به روش زیر عمل می کنیم.

متد	بلانک(B)	استاندارد(S)	نمونه(T)
محلول شفاف رویی حاصل از سانتریفیوژ	-	-	50µl
کالیبراتور(50MG/DL)	–	50µl	-
محلول آماده به کار	2ml	2ml	2ml

سپس لوله ها را مخلوط کرده و به مدت ۵min داخل بنماری ۳۷ درجه قرار داده و بعد با اسپکتوفتومتر در طول موج λ=۵٤٦nm ، جذبT وS را در مقایل بلانک قرائت می کنیم(٦۳).

محاسبه LDL ،HDL

رنج نرمال در آقایان: 30-60 mg/dl ، رنج نرمال در خانم ها: 40-70 mg/dl

$$cx = \frac{\text{A T}}{\text{A S}} * (50*1.1)(\text{MG/DL})$$

(CX)(میزان HDL-کلسترول در سرم یا پلاسمای بیماران بر حسب واحدmg/dl)

E stimated LDL: Total cholesterol-(HDL+TG/5)

ارزیابیT4

برای ارزیابی میزان T4 از کیت سنجش T4 به روش الایزا ساخت شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس ایران استفاده شد. در این تست الایزا از آنتی بادی منوکلونال اختصاصی که بر علیه یکی از شاخص های آنتی ژنیک مولکول T4 تهیه شده است، استفاده می شود. به این شکل که ،چاهکها با غلظت مشخصی از مونوکلونال آنتی بادی Anti-T4 پوشش داده میشوند. مقدار مشخصی سرم و آنتی ژن T4 کونژوگه شده با آنزیم HRP به چاهک اضافه می شود. در این روش از ۸- آنیلینو- ۱- نفتالن سولفونات (ANS) برای جدا کردن T4 از پروتئین های پلاسما برای اندازه گیری غلظت توتال T4 استفاده می شود. در زمان انکوباسیون، T4-HRP و T4 موجود در سرم و استاندارد برای اتصال به آنتی بادی مونوکلونال Anti-T4 موجود در کف چاهکها رقابت می کنند. پس از ٤٥ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق ، چاهک ها با محلول شستشو شسته می شوند. با افزودن محلول سوبسترا – رنگزا و انکوباسیون بمدت ۱۵ دقیقه رنگ آبی بوجود می آید. تولید رنگ با افزودن محلول توقف متوقف می گردد و رنگ آبی به زرد تبدیل می شود که شدت جذب در 450 nm اندازه گیری می شود. شدت رنگ رابطه معکوسی با غلظت T4 در نمونه مورد آزمایش دارد.

معرف ها

۱. پلیت پوشانده شده با آنتی بادی منوکلونال :Anti-T4 (۱ پلیت، ۹۶ چاهک).

۲. معرف کونژوگه آنزیمی:آنتی ژن T4 نشاندار شده با آنزیمHRP (۱ ویال، 12 ml)

۳. استانداردهای 0.0 , 2.5 ,5.0 ,10 ,15 ,30 µg/dl :T4 در بافر حاوی نگهدارنده (٦ ویال، ۰.۵ میلی لیتری).

٤. بافر شستشوی غلیظ PBS-Tween :(۱ ویال ۳۰ میلی لیتری،X۲۰)

۵. محلول سوبسترا- رنگزا: پروکسید هیدروژن و ترا متیل بنزدین .(TMB) (۱ ویال ۱۲ میلی لیتری)

٦. محلول توقف: اسید کلریدریک یک نرمال (۱ ویال، ٦ میلی لیتر).

۷. سرم کنترل: T4 در سرم به همراه نگهدارنده (۱ ویال،۱ میلی لیتر).

جمع آوری و آماده سازی نمونه ها

۱-سرم نمونه مناسب برای این آزمایش است.
۲- از نمونه های با کدورت بالا، همولیز شده و لیپمیک ترجیحا استفاده نشود.
۳- برای نگهداری کوتاه مدت نمونه ها، حداکثر به مدت ٤٨ ساعت، باید در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد نگهداری شوند .برای نگهداری طولانی تر، باید در دمای ۲۰ - درجه سانتیگراد قرار گیرند .نمونه های نگهداری شده باید قبل از آزمایش به خوبی مخلوط شوند.
٤-از فریز و ذوب مکرر نمونه ها اجتناب شود.

آماده سازی معرف ها

۱- همه معرف ها باید قبل از استفاده به دمای اتاق (۲۷ - ۲۲ درجه سانتیگراد) برسند.
۲-تهیه محلول شستشو :برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (20X) را با ۱۹ حجم آب مقطر رقیق نمائید.

روش انجام کار

۱- تعداد چاهک های کوت شده برای استانداردها، کنترل و نمونه های بیمار را بصورت ۲ تایی انتخاب کنید و مابقی چاهک ها را همراه ماده نمگیر درون کیسه مخصوص قرار داده و درب آنرا ببندید.

۲- ۵۰ میکرولیتر از استانداردها، کنترل و نمونه های بیمار را به داخل هر چاهک بریزید.

۳- ۱۰۰میکرولیتر از کونژوگه آنزیمی را به تمام چاهک ها اضافه کنید.

٤- پلیت را بمدت ۳۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات چاهک ها خوب مخلوط شوند. سپس درب چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده، آنرا بمدت ٤٥ دقیقه در دمای اتاق (۲۷ – ۲۲ درجه سانتیگراد) انکوبه کنید.

۵-محتویات چاهک ها را خالی کرده و چاهک ها را ۵ بار با ۳۵۰ میکرولیتر بافر شستشوی آماده مصرف بشوئید. برای شستشوی چاهک ها، ابتدا۳۵۰ میکرولیتر بافر شستشو را داخل چاهک بریزید، سپس چاهک ها را وارونه کرده و همراه با تکان دادن خالی کنید و در انتهای شستشو، با ضربات ملایم بر روی کاغذ جاذب تمامی مایع موجود در چاهک ها را تخلیه نمائید.

٦-۱۰۰میکرولیتر از سوبسترای آماده مصرف به تمامی چاهک ها اضافه کنید و آنها را بمدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمائید.

۷-۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش به همه چاهک ها اضافه کنید. سپس جذب نور هر چاهک را در طول موج ٤٥۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت نمائید (در صورت امکان از طول موج ٦۳۰ نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید). سنجش جذب نوری باید حداکثر تا ۱۵ دقیقه پس از اتمام آزمایش انجام شود(٦٤).

ارزیابی T3

برای ارزیابی میزان T3 از کیت سنجش T3 به روش الایزا ساخت شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس ایران استفاده شد. در این تست الایزا از آنتی بادی منوکلونال اختصاصی که بر علیه یکی از شاخص های آنتی ژنیک مولکول T3 تهیه شده است، استفاده می شود. به این شکل که ،چاهکها با غلظت مشخصی از مونوکلونال آنتی بادی Anti-T3 پوشش داده میشوند. مقدار مشخصی سرم و آنتی ژن T3 کونژوگه شده با آنزیم HRP به

چاهک اضافه می شود. در این روش از ۸- آنیلینو- ۱- نفتالن سولفونات (ANS) برای جدا کردن T3 از پروتئین های پلاسما برای اندازه گیری غلظت توتال T3 استفاده می شود. در زمان انکوباسیون، T3-HRP و T3 موجود در سرم و استاندارد برای اتصال به آنتی بادی مونوکلونال Anti-T4 موجود در کف چاهکها رقابت می کنند. پس از ٤٥ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق ، چاهک ها با محلول شستشو شسته می شوند. با افزودن محلول سوبسترا - رنگزا و انکوباسیون بمدت ۱۵ دقیقه رنگ آبی بوجود می آید. تولید رنگ با افزودن محلول توقف متوقف می گردد و رنگ آبی به زرد تبدیل می شود که شدت جذب در 450 nm اندازه گیری می شود. شدت رنگ رابطه معکوسی با غلظت T3 در نمونه مورد آزمایش دارد.

معرف ها

۱. پلیت پوشانده شده با آنتی بادی منوکلونال :Anti-T3 (۱ پلیت، ۹٦ چاهک).

۲. معرف کونژوگه آنزیمی:آنتی ژن T3 نشاندار شده با آنزیمHRP (۱ ویال، 12 ml)

۳. استانداردهای 0.0 , 2.5 ,5.0 ,10 ,15 ,30 µg/dl :T4 در بافر حاوی نگهدارنده (٦ ویال، ۰.۵ میلی لیتری).

٤. بافر شستشوی غلیظ PBS-Tween :(۱ ویال ۳۰ میلی لیتری،X۲۰)

۵. محلول سوبسترا- رنگزا: پروکسید هیدروژن و تترا متیل بنزدین .(TMB) (۱ ویال ۱۲ میلی لیتری)

٦. محلول توقف: اسید کلریدریک یک نرمال (۱ ویال، ٦ میلی لیتر).

۷. سرم کنترل: T3 در سرم به همراه نگهدارنده (۱ ویال،۱ میلی لیتر).

جمع آوری و آماده سازی نمونه ها

۱-سرم نمونه مناسب برای این آزمایش است.
۲- از نمونه های با کدورت بالا، همولیز شده و لیپمیک ترجیحا استفاده نشود.

۳- برای نگهداری کوتاه مدت نمونه ها، حداکثر به مدت ٤٨ ساعت، باید در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد نگهداری شوند .برای نگهداری طولانی تر، باید در دمای ۲۰ - درجه سانتیگراد قرار گیرند .نمونه های نگهداری شده باید قبل از آزمایش به خوبی مخلوط شوند.
٤-از فریز و ذوب مکرر نمونه ها اجتناب شود.

آماده سازی معرف ها

۱- همه معرف ها باید قبل از استفاده به دمای اتاق (۲۷ - ۲۲ درجه سانتیگراد)
برسند.
۲-تهیه محلول شستشو :برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (20X)
را با ۱۹ حجم آب مقطر رقیق نمائید.

روش انجام کار
۱- تعداد چاهک های کوت شده برای استانداردها، کنترل و نمونه های بیمار را بصورت ۲ تایی انتخاب کنید و مابقی چاهک ها را همراه ماده نمگیر درون کیسه مخصوص قرار داده و درب آنرا ببندید.
۲- ۵۰ میکرولیتر از استانداردها، کنترل و نمونه های بیمار را به داخل هر چاهک بریزید.
۳- ۱۰۰میکرولیتر از کونژوگه آنزیمی را به تمام چاهک ها اضافه کنید.
٤- پلیت را بمدت ۳۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات چاهک ها خوب مخلوط شوند. سپس درب چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده، آنرا بمدت ٤٥ دقیقه در دمای اتاق (۲۷ - ۲۲ درجه سانتیگراد) انکوبه کنید.
۵-محتویات چاهک ها را خالی کرده و چاهک ها را ۵ بار با ۳۵۰ میکرولیتر بافر شستشوی آماده مصرف بشوئید. برای شستشوی چاهک ها، ابتدا۳۵۰ میکرولیتر بافر شستشو را داخل چاهک بریزید، سپس چاهک ها را وارونه کرده و همراه با تکان دادن خالی کنید و در انتهای شستشو، با ضربات ملایم بر روی کاغذ جاذب تمامی مایع موجود در چاهک ها را تخلیه نمائید.
٦-۱۰۰میکرولیتر از سوبسترای آماده مصرف به تمامی چاهک ها اضافه کنید و آنها را بمدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمائید.
۷-۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش به همه چاهک ها اضافه کنید. سپس جذب نور هر چاهک را در طول موج ٤٥۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت نمائید (در صورت امکان از طول موج ٦۳۰ نانومتر

بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید). سنجش جذب نوری باید حداکثر تا ۱۵ دقیقه پس از اتمام آزمایش انجام شود(٦٤).

ارزیابی TSH

کیت سنجش TSH شرکت تولیدی، دانش بنیان پیشگامان سنجش ایساتیس ایران بر مبنای اصول الایزا نوع ساندویچ عمل می کند. در این کیت از فن آوری استرپتاویدین در پوشاندن فاز جامد استفاده شده است. به طور خالص استاندارد یا کنترل یا نمونه بیمار هم زمان با معرف کونژوگه که حاوی دو نوع آنتی بادی علیه TSH یکی کونژوگه با بیوتین و دیگری کونژوگه با آنزیم HRP است و TSH را از دو جایگاه متفاوت شناسایی می کنند به چاهک های پوشیده شده از استرپتاویدین اضافه می شوند TSH .موجود در استاندارد/کنترل/ نمونه بیمار بین دو آنتی بادی به حالت ساندویچ در آمده و مجموعه از طریق بیوتین به استرپتاویدین فاز جامد متصل می شود. سپس اجزای متصل نشده طی شستشو از محیط خارج و با افزودن محلول سوبسترا – رنگزا و انکوباسیون

بمدت ۱۵ دقیقه رنگ آبی بوجود می آید. با افزودن محلول توقف، تولید رنگ متوقف می گردد که شدت جذب نوری در ٤٥٠ نانومتر اندازه گیری می شود .شدت رنگ با مقدار TSHموجود در سرم نسبت مستقیم دارد .

معرف ها

معرف		۱۹۲ تستی	آماده سازی
پلیت پوشیده شده با استرپتاویدین		2×96 wells	آماده مصرف
کالیبراتور۱-۶ (۰، ۰/۵، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۵ µIU/mL) در بافر، به همراه نگهدارنده با قابلیت ردیابی نسبت به ماده مرجع WHO 2nd IRP 80/558		6 ×2.0 mL	آماده مصرف
نمونه های کنترل طبیعی و بالا در بافر سازگار با سرم انسانی همراه با نگهدارنده(بازه قابل قبول سرم کنترل برروی برچسب قید شده است)		2 ×2.0 mL	آماده مصرف
رقیق کننده نمونه(sample diluent)		1 ×2.5 mL	آماده مصرف
کونژوگه (قرمز رنگ)		1 ×12.0 mL	آماده مصرف
محلول شستشو غلیظ		1 ×50 mL	به نسبت ۱ به ۲۰ با آب مقطر یا آب دیونیزه رقیق کنید
محلول سوبسترا-رنگ زا(تترامتیل بنزیدین و آب اکسیژنه)		2 ×12.0 mL	آماده مصرف
محلول توقف(اسید سولفوریک ۱۲/. مولار)		1 ×12.0 mL	آماده مصرف

جمع آوری و آماده سازی نمونه ها

۱–سرمEDTA مناسب برای این آزمایش است.

۲– از نمونه های با کدورت بالا، همولیز شده و لیپمیک ترجیحا استفاده نشود.

۳– برای نگهداری کوتاه مدت نمونه ها، حداکثر به مدت ٤٨ ساعت، باید در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد نگهداری شوند .برای نگهداری طولانی تر، باید در دمای ۲۰ – درجه سانتیگراد قرار گیرند .نمونه های نگهداری شده باید قبل از آزمایش به خوبی مخلوط شوند.

٤–از ذوب و انجماد مکرر نمونه ها اجتناب شود. نمونه های منجمد باید قبل از آزمایش به آرامی، اما به طور

کامل مخلوط شده تا کاملاً یکنواخت و همگن گردد

آماده سازی معرف ها

۱– همه معرف ها باید قبل از استفاده به دمای اتاق (۲۷ - ۲۲ درجه سانتیگراد)

برسند.

۲–تهیه محلول شستشو :برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (20X) را با ۱۹ حجم آب مقطر رقیق نمائید.

روش انجام کار

۱– تعداد چاهک های کوت شده برای استانداردها، کنترل و نمونه های بیمار را بصورت ۲ تایی انتخاب کنید و مابقی چاهک ها را همراه ماده نمگیر درون کیسه مخصوص قرار داده و درب آنرا ببندید.

۲- ۵۰ میکرولیتر از استانداردها، کنترل و نمونه های بیمار را به داخل هر چاهک بریزید.
۳- ۱۰۰میکرولیتر از کونژوگه آنزیمی را به تمام چاهک ها اضافه کنید.
٤- پلیت را بمدت ۳۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات چاهک ها خوب مخلوط شوند. سپس درب چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده، آنرا بمدت ٤٥ دقیقه در دمای اتاق (۲۷ - ۲۲ درجه سانتیگراد) انکوبه کنید.
۵- محتویات چاهک ها را خالی کرده و چاهک ها را طبق دستورالعمل زیر شستشو دهید:
محتویات چاهک ها را خالی کرده و چاهک ها را ۵ بار با ۳۵۰ میکرولیتر بافر شستشوی آماده مصرف بشوئید. برای شستشوی چاهک ها، ابتدا ۳۵۰ میکرولیتر بافر شستشو را داخل چاهک بریزید، سپس چاهک ها را وارونه کرده و همراه با تکان دادن خالی کنید و عمل شستشو را چهار بار دیگر)جمعاً به مدت ۵ بار(تکرار کنید. در انتهای شستشو، با ضربه زدن مالیم پلیت بر روی کاغذ جاذب رطوبت، تمامی مایع موجود در چاهک ها را تخلیه نمائید. بهتر است برای شستشو از دستگاه های اتوماتیک واشر که قابل برنامه ریزی است استفاده نمایید. که در این صورت به دستورالعمل دستگاه شستشو مراجعه نمایید.
٦-۱۰۰میکرولیتر از سوبسترای آماده مصرف به تمامی چاهک ها اضافه کنید و آنها را بمدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمائید.
۷-۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش به همه چاهک ها اضافه کنید. سپس جذب نور هر چاهک را در طول موج ٤٥۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت نمائید (در صورت امکان از طول موج ٦۳۰ نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید). سنجش جذب نوری باید حداکثر تا ۱۵ دقیقه پس از اتمام آزمایش انجام شود(٦٤).

ارزیابیAnti TPO

برای ارزیابی میزان Anti TPO از کیت سنجشAnti TPO به روش الایزا ساخت شرکت Mybiosource آمریکا استفاده شد. در پدیده کمی لومینسانس واکنش شیمیایی باعث تهییج الکترون ها می شود ولی حاصل این تهییج مشابه فلورسانس بوده و در حین بازگشت الکترون به سطح پایه انرژی ، نور نشری پدید می آید . در کمی لومینسانس ترکیبات آلی اکسید می شوند. این ترکیبات از قبیل لومینول و ایزولومینول می باشند که با یک عامل اکسید کننده (مثل پراکسید هیدروژن ، هیپوکلرید یا اکسیژن) واکنش کامل شده و نورنشری از فراورده های تهییج شده در واکنش اکسیداسیون حاصل می آید .

این واکنش ها در حضور کاتالیزور ها از قبیل آنزیم ها ، یون های فلزی و یا کمپلکس های فلزی و hemin انجام می شود .

جمع آوری و آماده سازی نمونه ها

نمونه سرم یا پلاسمای هپارینه یا EDTA

نمونه نباید همولیز ، لیپمیک و یا ایکتریک باشد.

نمونه باید شفاف و فاقد هر گونه Clot و یا رشته های فیبرین باشد.

حداقل حجم مورد نیاز برای سنجش Anti TPO توسط دستگاه Liason مقدار ۱۰۰ میکرولیتر می باشد.

ذخیره سازی نمونه در دمای ۲-۸°c به مدت۷ روز

ذخیره سازی نمونه در دمای -۲۰°c جهت نگهداری بیش از ۷ روز

نمونه های ذخیره شده در فریز بعد از دفریز شدن باید توسط ورتکس، همگن شوند.

از فریز کردن نمونه هایی که قبلاً دفریز شده اند به شدت اجتناب شود .

روش انجام آزمایش :

کیت مورد نظر را حداقل نیم ساعت قبل از انجام آزمایش در جایگاه خود قرار میگیرد.

نمونه ها را به ترتیب در A-Rack قرار دهید و A-Rack را در جایگاه مخصوص خود جای میگیرد.

از روی مانیتور شماره بیمار و نوع تست را انتخاب می شود.

دستگاه را start کرده و سپس جذب نور هر چاهک را در طول موج ٤٥٠ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت می شود (در صورت امکان از طول موج ٦٣٠ نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده می شود). سنجش جذب نوری باید حداکثر تا ۱۵ دقیقه پس از اتمام آزمایش انجام می شود(٦٥).

۳-٤- بررسی ها و روش های تجزیه وتحلیل آماری

به منظور آنالیز آماری، نتایج و مقایسه بین میانگین نتایج در هر گروه و بین گروههای مختلف در پایان دوره آزمایش، از روش تست های آماری T-test, ANOVA استفاده شد. تمامی تجزیه و تحلیل با استفاده از نرم

افزار کامپیوتری SPSS انجام گرفت. کلیه نتایج به صورت (X±SEM)’گزارش شده و سطح معنی دار بودن نتایج، با (P<0/05) معنی دار تلقی شد.

فصل چهارم: نتایج

٤-١- مقدمه

در این پژوهش با هدف بررسی تاثیر عصاره هیدروالکلی گردوی سیاه بر برخی فاکتورهای‌های خونی، آزمایشی با طرح کاملا تصادفی با پنج گروه آزمایشی (شاهد، تنش متی‌مازول، عصاره گردو، تنش متی‌مازول و عصاره گردو و تنش متی‌مازول و لووتیروکسین) و شش تکرار رت انجام شد. فاکتورهای خونی شامل آنتی‌بادی پراکسیداز تیروئید (Anti-TPO)، هورمون محرک تیروئید (TSH)، هورمون‌های تیروکسین (T4)، تری یدوتیرونین (T3)، لیپویروتئین‌های با چگالی بالا (HDL)، لیپویروتئین‌های با چگالی پایین (LDL)، کلسترول و تری‌گلیسرید اندازه‌گیری شد. جهت بررسی اثرات معنی‌دار تیمارها بر هر کدام از متغیرهای اندازه‌گیری‌شده، از روش تجزیه‌واریانس یکطرفه استفاده شد. مقایسه میانگین‌های گروه‌های تیماری با آزمون توکی انجام شد.

٤-٢-نتایج

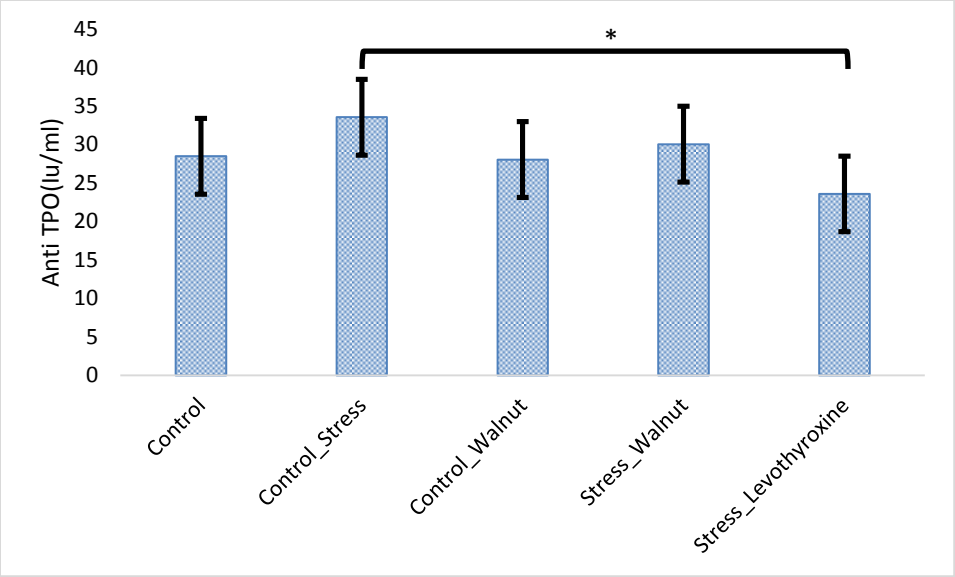
نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها، میانگین تیمارها و مقایسه و گروه‌بندی آنها در جدول ٤-١ نشان داده شده است. نتایج نشان داد تیمارهای آزمایشی اثر معنی‌داری بر غلظت هورمون‌های تیروکسین، تری یدوتیرونین، لیپوپروتئین با چگالی پایین، کلسترول و تری‌گلیسرید داشته است، در حالی که بر غلظت لیپوپروتئین با چگالی بالا تاثیر مشهودی نداشتند.

جدول ٤-١ میانگین متغیرهای مورد بررسی در تیمارهای آزمایشی

متغیر	تیمار					SEM	p-val
	شاهد	تنش متی‌مازول	عصاره گردو	تنش متی‌مازول- عصاره گردو	تنش متی‌مازول- لووتیروکسین		
Anti-TPO (Iu/ml)	٢٨.٥±٥.٦	٣٣.٦±٢.٤	٢٨.١±٥.٢٥	٣٠.١±٤.٥	٢٣.٦±٦.٠	٤.٩٢	٠.٠٢٩
هورمون محرک تیروئید (mIu/L)	١.٧±٠.٧٠	٢.٦±٠.٣٤	١.٣±٠.٣٥	١.٦±٠.٤٧	١.٢±٠.٤٤	٠.٤٨	٠.٠٠٠٣
تیروکسین (T4) (نانو گرم/دسی لیتر)	٦.٤٥± ٠.٣٤	٥.٥١± ٠.٤٢	٥٨٣±٠.٤٥	٦.١٥±٠.٣٥	٦.٣±٠.٤٨	٠.٤١	٠.٠٠٠٥
تری یدوتیرونین (T3) (نانو گرم/دسی لیتر)	c٠.٧٥± ٠.١	ab٠.٥± ٠.٠٦	ab٠.٥±٠.١	a٠.٤٥±٠.١	ab٠.٥٥±٠.١	٠.١١	٠.٠٠٠٥
HDL (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	٣٧.١٧± ١.٥	٣٧.٥±٣.٧	٣٩±١.٨	٣٥.٥±١.٥	٣٥.٦±٢.٣	٢.٣	٠.٠٧٥
LDL (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	b٧.٥±٠.٥	b٧.٥±٠.٥	a٦±٠.٦	ab٦.٥±١.١	a٥.٣٣±١.٢	٠.٨٤	٠.٠٠٠٤
کلسترول (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	a٦٥±٤.٢	a٦٣±٣.٢	a٦٤.٥±٢.٩	b٥٩.٣±١.٢	a٥٩.٨±٤.٢	٣.٣٢	٠.٠١٦
تری‌گلیسرید (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	c٨٢.٥± ٤.٦	c٨١.٧± ٢.٢	bc٧٨±٦.٩	ab٧١.٨±٢.١	a٦٨±٥.٤	٤.٦٤	>٠.٠٠٠١

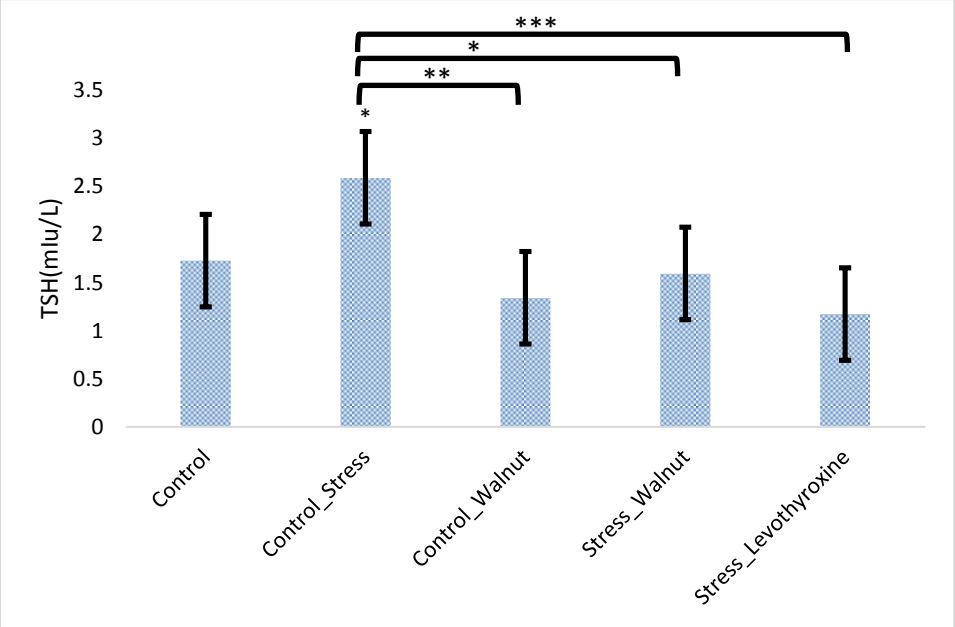
میانگین‌های با حروف نامشابه در هر ردیف، دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ٠.٠٥ هستند.

ایجاد تنش با متی‌مازول باعث افزایش سطح Anti-TPO در مقایسه با گروه کنترل شده و تجویز عصاره مغز گرودی سیاه باعث کاهش سطح در مقایسه با گروه کنترل استرسی شده که البته این کاهش معنی دار نبوده است، اما تجویز داروی لووتیروکسین باعش کاهش معنی دار سطح Anti-TPO در مقایسه با گروه کنترل استرسی گردیده است (نمودار ٤-١).



نمودار ٤-١ میانگین غلظت آنتی‌بادی تیروئید پراکسیداز در تیمارهای آزمایشی

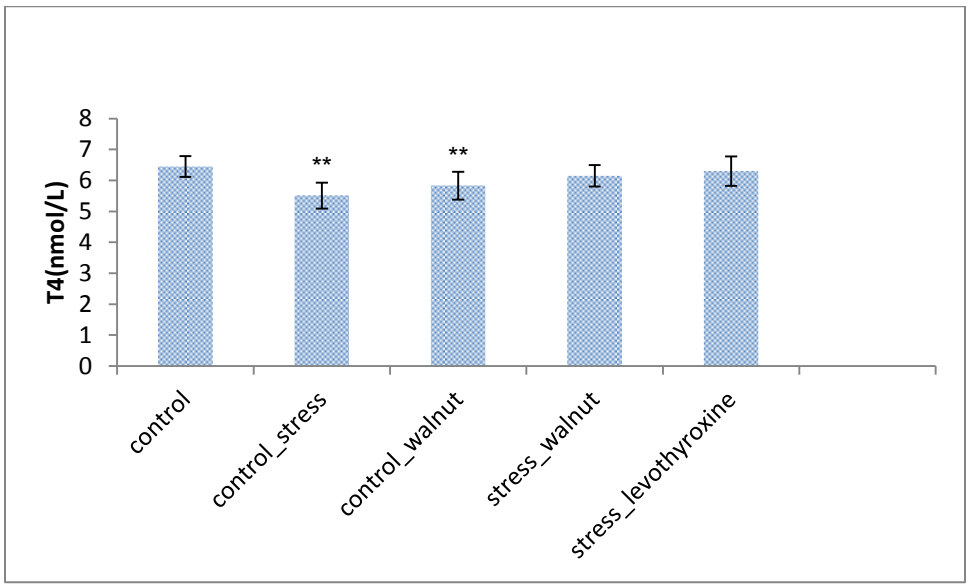
ستاره‌های بالای هر مستطیل نشانه اختلاف میانگین آن تیمار با گروه شاهد و ستاره رو خط افقی، نشانه اختلاف میانگین‌های دو تیمار در سطح ۰.۰۵ (*)، ۰.۰۱ (**) یا ۰.۰۰۱ (***) است.



نمودار ٤-٢ اثر تیمارهای آزمایشی بر غلظت هورمون محرک تیروئید

ستاره‌های بالای هر مستطیل نشانه اختلاف میانگین آن تیمار با گروه شاهد و ستاره رو خط افقی، نشانه اختلاف میانگین‌های دو تیمار در سطح ۰.۰۵ (*)، ۰.۰۱ (**) یا ۰.۰۰۱ (***) است.

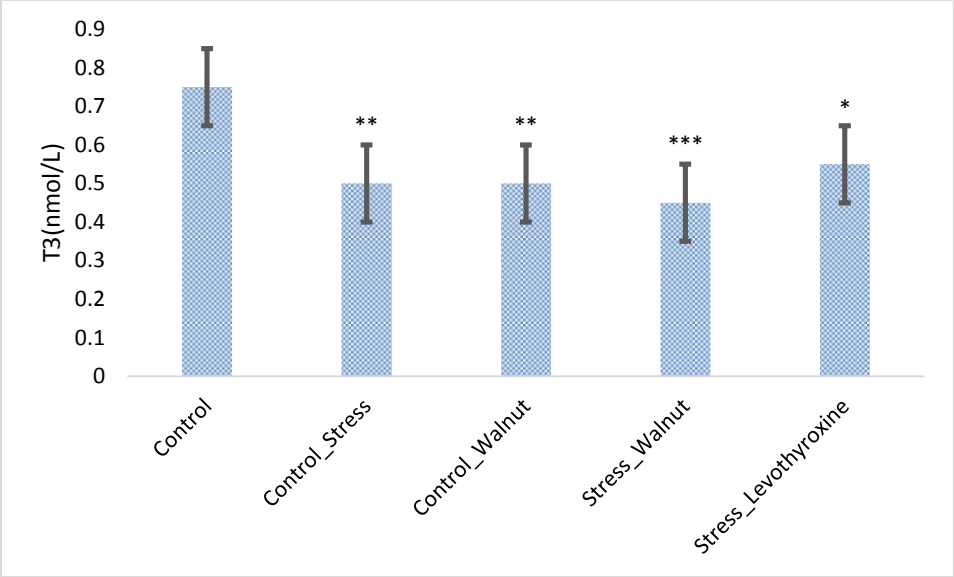
نمودار ٤-٢ نشان می‌دهد که غلظت هورمون محرک تیروئید در موش‌های تحت تنش با متی‌مازول در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت ($p<0.05$). تیمارهای عصاره گردو در هر دو گروه رت‌ها با و بدون تنش با متی‌مازول موجب کاهش میزان هورمون محرک تیروئید شد($p<0.05$). مصرف لووتیروکسین به همراه متی‌مازول نیز توانست غلظت هورمون محرک تیروئید را کاهش دهد ($p<0.05$).



نمودار ٤-٣ اثر تیمارهای آزمایشی بر غلظت هورمون تیروکسین (T4)

ستاره‌های بالای هر مستطیل نشانه اختلاف میانگین آن تیمار با گروه شاهد و ستاره رو خط افقی، نشانه اختلاف میانگین‌های دو تیمار در سطح ۰.۰۵ (*)، ۰.۰۱ (**) یا ۰.۰۰۱ (***) است.

نمودار ٤-٣ نشان می‌دهد در اثر ایجاد تنش در رت با استفاده از متی‌مازول غلظت هورمون تیروکسین (T4) خون کاهش یافت شد (اختلاف با تیمار شاهد) ($p<0.05$)، در حالی‌که عصاره گردو با و بدون متی‌مازول، و لووتیروکسین همراه با متی‌مازول باعث افزایش شد.



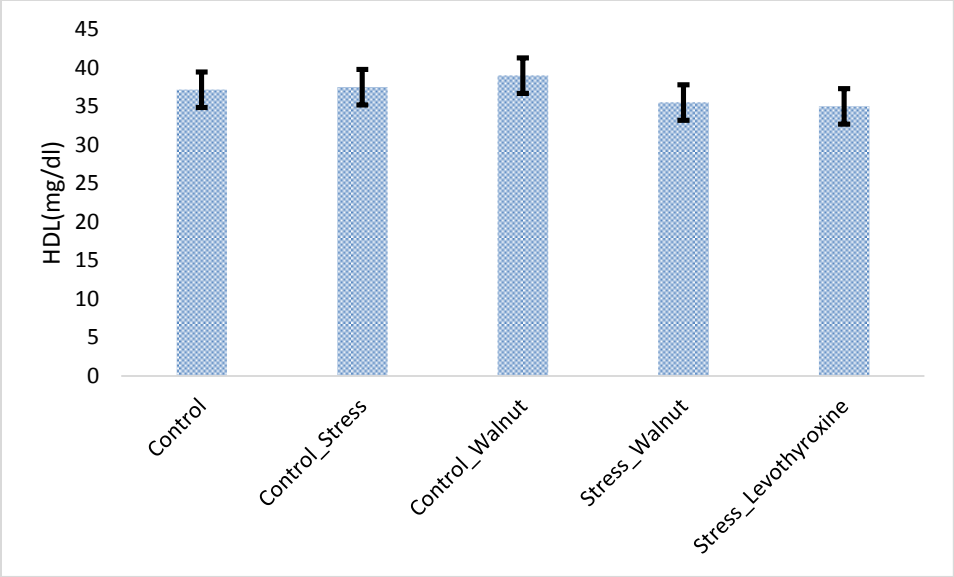
نمودار ٤-٤ اثر تیمارهای آزمایشی بر میانگین غلظت هورمون تری یدوتیرونین (T3)

ستاره‌های بالای هر مستطیل نشانه اختلاف میانگین آن تیمار با گروه شاهد در سطح ۰.۰۵ (*)، ۰.۰۱ (**) یا ۰.۰۰۱ (***) است.

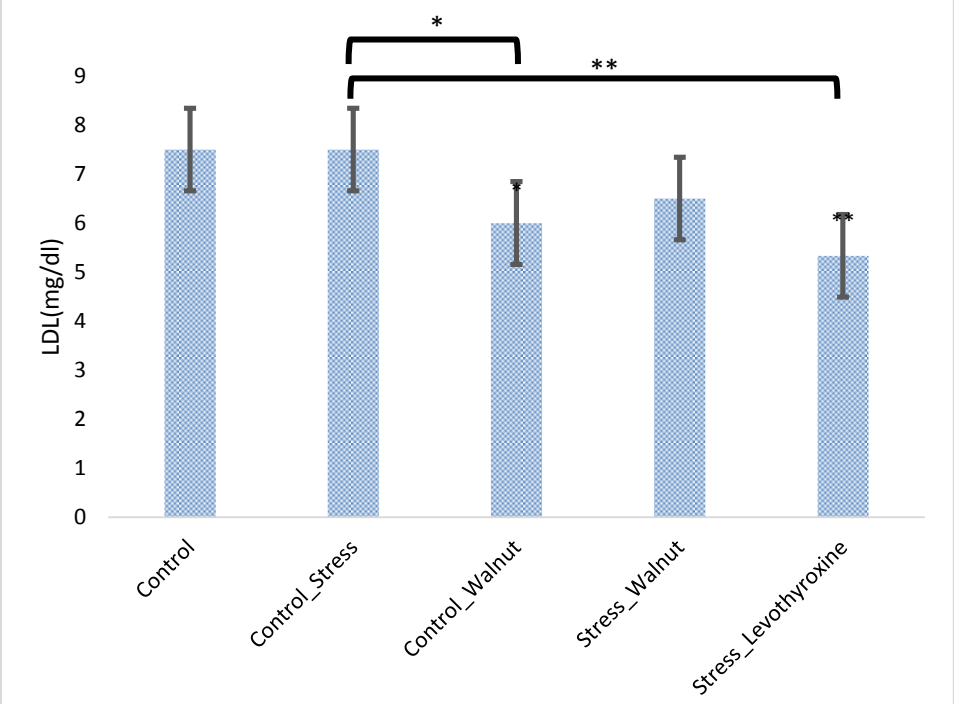
ایجاد تنش با متی‌مازول موجب کاهش غلظت هورمون تری یدوتیرونین (T3) در رت‌ها شد، در حالیکه تجویز عصاره گردوی سیاه و لووتیروکسین باعث افزایش سطح T3 در مقایسه با گروه کنترل استرسی گردید. ($p<۰.۰۵$) (نمودار ٤-٤).

غلظت لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL) در خون رت‌های گروه‌های مختلف آزمایشی تفاوت معنی‌داری نداشتند ($p>۰.۰۵$) (نمودار ٤-٥).

غلظت لیپوپروتئین با چگالی پایین (LDL) در گروه تنش متی‌مازول تفاوت معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد نداشت ($p>۰.۰۵$)، اما در رت‌های دریافت‌کننده عصاره گردو بدون متی‌مازول و رت‌های دریافت‌کننده لووتیروکسین همراه با متی‌مازول غلظت LDL کاهش معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد و گروه تنش با متی‌مازول نشان داد ($p<۰.۰۵$) (نمودار ٤-٦).



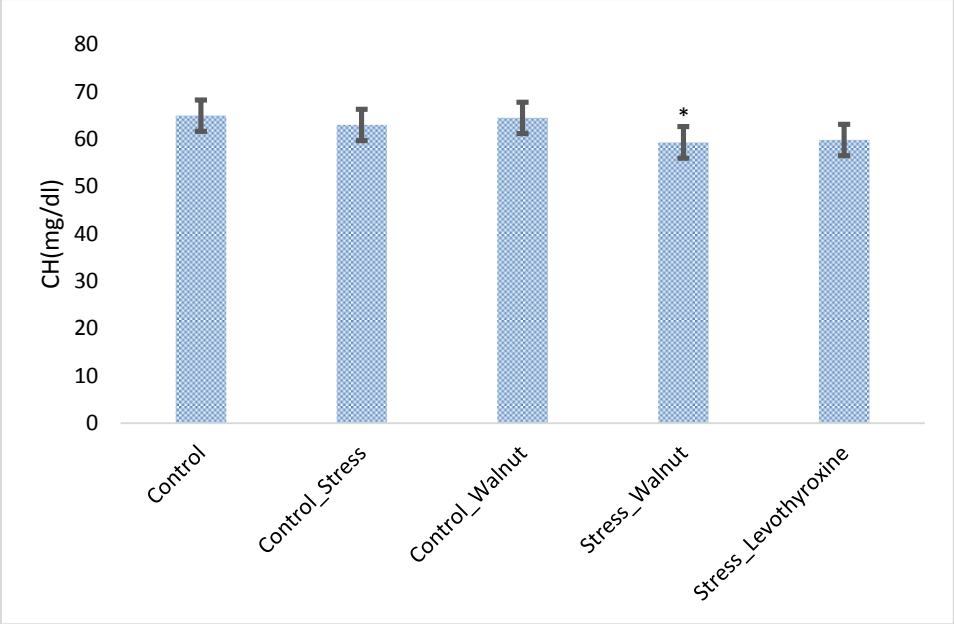
نمودار ٤-٥ اثر تیمارهای آزمایشی بر میانگین غلظت لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL)



نمودار ٤-٦ اثر تیمارهای آزمایشی بر میانگین غلظت لیپوپروتئین با چگالی پایین (LDL)

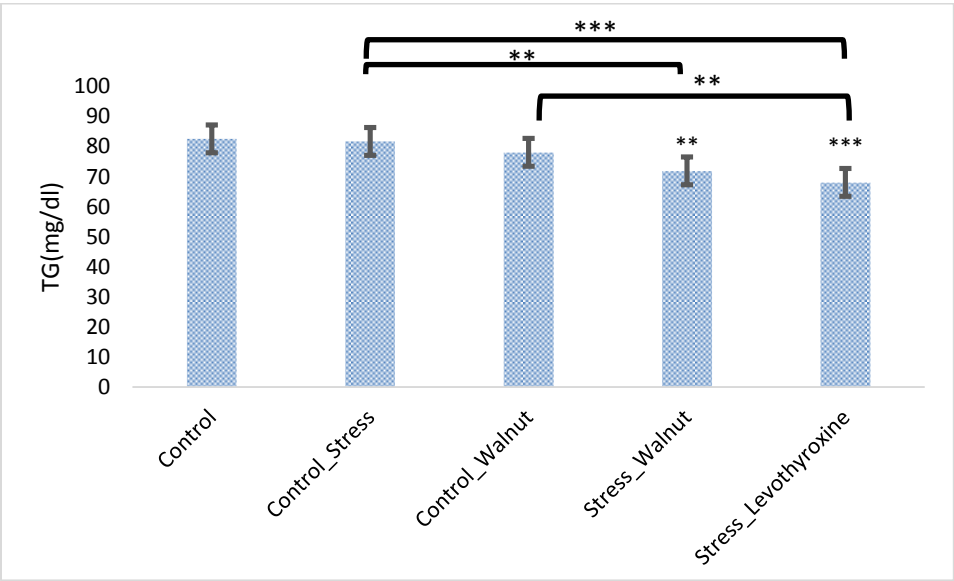
ستاره‌های بالای هر مستطیل نشانه اختلاف میانگین آن تیمار با گروه شاهد و ستاره رو خط افقی، نشانه اختلاف میانگین‌های دو تیمار در سطح ۰.۰۵ (*)، ۰.۰۱ (**) یا ۰.۰۰۱ (***) است.

غلظت کلسترول خون در رت‌های دریافت‌کننده عصاره گردو همراه با متی‌مازول در مقایسه با گروه رت‌های شاهد کاهش معنی‌داری داشت ($p<0.05$) ولی در مقایسه با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نداشت ($p>0.05$) (نمودار ٤-٧).



نمودار ٤-٧ اثر تیمارهای آزمایشی بر میانگین غلظت کلسترول خون

ستاره‌های بالای هر مستطیل نشانه اختلاف میانگین آن تیمار با گروه شاهد در سطح ۰.۰۵ (*)، ۰.۰۱ (**) یا ۰.۰۰۱ (***) است.



نمودار ٤–٨ اثر تیمارهای آزمایشی بر میانگین غلظت تری‌گلیسرید خون (TG)

ستاره‌های بالای هر مستطیل نشانه اختلاف میانگین آن تیمار با گروه شاهد و ستاره رو خط افقی، نشانه اختلاف میانگین‌های دو تیمار در سطح ۰.۰۵ (*)، ۰.۰۱ (**) یا ۰.۰۰۱ (***) است.

غلظت تری‌گلیسرید خون رت‌های گروه شاهد، تنش با متی‌مازول و گروه عصاره گردو تفاوت معنی‌داری از هم نداشتند ($p>0.05$)، در حالیکه غلظت تری‌گلیسرید خون در گروه عصاره گردو همراه با متی‌مازول و گروه لووتیروکسین همراه با تنش متی‌مازول کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد و گروه تنش متی‌مازول نشان دادند ($p<0.05$)، کاهش در گروه لووتیروکسین همراه با تنش متی‌مازول غلظت تری‌گلیسرید خون کمتر از گروه عصاره گردو بود ($p<0.05$) (شکل ٤–٨).

فصل پنجم: بحث ، نتیجه‌گیری و پیشنهادات

۵-۱-بحث

حفظ هموستاز بدن نکته کلیدی در سلامت انسان است که به وسیله عوامل متعددی به ویژه محور هورمونی هیپوفیز- تیروئید کنترل می‌شود، به طوری که کم‌کاری‌ها و پرکاری‌های تیروئیدی موجب اختلال در سلامت بدن می‌شوند. اختلالات تیروئیدی در صورت عدم درمان ضایعات جبران‌ناپذیری را بر بیمار تحمیل می‌نماید و در پزشکی از روش‌های گوناگونی در درمان اختلالات تیروئیدی استفاده می‌شود. هدف از این پژوهش یررسی تاثیر عصاره آبی الکلی گردو بر آنتی‌بادی ضدپراکسیداز تیروئید، سطوح پلاسمایی هورمون‌های محور هیپوفیز-تیروئید و فراسنجه‌های پلاسمای خون بود.

در پژوهش رضایی ارمی و همکاران (۲۰۱۲) خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ گردو به اثبات رسید که این خاصیت، به ترکیبات فنلی موجود در عصاره‌ها نسبت داده شد. آنها عصاره برگ گردو را به عنوان منبع بالقوه‌ای از ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی معرفی کردند. برگ گردو دارای دو گروه عمده از ترکیبات فنلی کافئوئیلوینیک اسید و کوماروئیلکوینیک اسید می‌باشد، مهم‌ترین فلاونوئیدهای موجود در برگ گردو ژوگلون، کوئرستین گالاکتوزید، مشتق‌های کوئرستین پنتوزید، کوئرستین آرابینووزید، کوئرستین گزیلوزید، کوئرستین رامنوزید و مشتق‌های کامپفرول پنتوزید می‌باشند(٦٠). در طب سنتی به طور گسترده برای درمان بیماری‌های مزمن استفاده می‌شود. همچنین دارای خاصیت ضدسرطانی، تصفیه‌کنندگی خون و آنتی‌اکسیدانی است(٦١).

نتیجه این مطالعه نشان داد که عصاره هیدروالکی گردو اثر معنی‌داری بر غلظت آنتی‌بادی پراکسیداز تیروئید نداشت، به طور کلی امروزه نقش آنتی‌بادی پراکسیداز تیروئید در روند تخریب بافتی مرتبط با هیپوتیروئیدی ناشی از تیروئیدیت هاشیموتو و تیروئیدیت آتروفیک و اثرات سیتوتوکسیک آن بر سلول‌های تیروئید به علت قدرت فیکساسیون کمپلان اثبات شده است(٦٢).

در مطالعه Mariotti و همکاران(۲۰۰۷) آنتی بادی anti-TPO دربیماران تیروئیدیت هاشیموتو و بیماران مبتلا به گریزو مثبت بود، که این محققان دریافتند که سطح آنتی بادیanti-TPO در بیماران تیروئیدیت هاشیموتو پس از درمان با لووتیروکسین و در بیماران مبتلا به گریوز پس از درمان با متی مازول، به میزان قابل توجهی کاهش می یابد(٦٦). همچنین در مطالعه Batabyal و Das (۲۰۰۵) آنتی بادی anti-TPO در افراد مبتلا به تیروئیدیت پس از دمان با لووتیروکسین به میزان قابل توجهی کاهش یافت(٦٧).

در مطالعه حاضر عصاره گردوی سیاه موجب کاهش سطح هورمون محرک تیروئید در رت‌ها شد، اثر کاهشی عصاره گردوی سیاه بر غلظت TSH مانند لووتیروکسین بوده است و در هر دو گروه با و بدون تنش بوسیله متی‌مازول سطح TSH را به سطح گروه شاهد رساند.

هایپوتیروئیدیسم به صورت افزایش در غلظت هورمون محرکه تیروئید(TSH) که در ارتباط با غلظت تری یدوتیرونین(T3) و تیروکسین(T4) آزاد است، بوجود می‌اید(۵۳).

طبق نتایج مطالعه آذرنیوشان و همکاران (۲۰۱۱) غلظت سرمی TSH در موش‌های صحرایی نر بالغ با مصرف عصاره گیاه بیلهر با دوز حداقل (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیشتر از گروه‌های شاهد و کنترل و همچنین گروه‌های با مصرف سطوح بالاتر عصاره گیاه بیلهر بود که احتمالا ناشی از حضور ترکیبات فیتواستروژنی در عصاره می‌باشد، چنانچه استروژن با خودمهاری نرون‌های گابا باعث افزایش میزان نوراپی‌نفرین از طریق گیرنده‌های آلفاآدرنرژیکی باعث افزایش TRH شده که در نتیجه آن افزایش سنتز و ترشح TSH رخ می‌دهد. حضور ترکیبات فلانوئیدی با ممانعت از آنزیم تیروپراکسیداز (TPO) که کلید بیوسنتز هورمون‌های تیروئیدی می‌باشد باعث کاهش در میزان هورمون‌های تیروئیدی می‌شود، همچنین فلانوئیدها با ممانعت از فعال شدن آنزیم دیوداز نوع I که به طور اختصاصی توسط TSH فعال می‌شود

و همچنین پیشگیری از معدنی شدن ید در سلول‌های تیروئید، باعث تغییراتی در میزان هورمون‌های تیروئیدی می‌شوند (٦٨).

عباسی (٢٠١٧) نشان دادند تیموکینون و عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه سطح سرمی هورمون TSH خون موش‌های صحرایی نر را کاهش داد(٦٩).

عصاره هیدروالکلی گرودی سیاه موجب افزایش سطح هورمون تیروکسین(T4) خون رت‌های این مطالعه شد، همچنین در مورد غلظت تری یدوتیرونین (T3)، عصاره گردوی سیاه موجب افزایش غلظت آن در مقایسه با تیمار تنش متی مازول شد.

کاهش نسبی در فعالیت پراکسیداسیون لیپید کبدی (LPO) همراه با افزایش در فعالیت‌های آنزیم‌های CAT و SOD در عصاره بسیاری از گیاهان دارویی نشان داده شده است و ارتباط این آنزیم‌ها با هورمون‌های تیروئیدی روشن است (٧٠). در پژوهش میرازی و همکاران (٢٠١٢) نشان داده شد که عصاره هیدروالکلی گیاه مریم‌گلی می‌تواند بر عملکرد تیروئید موثر باشد و سبب افزایش هورمون‌های تیروئیدی در موش‌های صحرایی هیپوتیروئیدی شد. عصاره هیدروالکلی برخی گیاهان مانند مریم‌گلی بخاطر خواص ضدپراکسیدازی و ضداکسیدانی، غلظت هورمون‌های تری یدوتیرونین (T3) و تیروکسین (T4) را بالا ببرند (٧٠).

نتایج تحقیق عباسی (٢٠١٧) نشان داد، تیموکینون و عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه باعث افزایش هورمون‌های تیروئیدی در سرم موش‌های صحرایی شد(٦٩). حسینی و همکاران (٢٠٠٩) در بررسی اثر دانه گیاه اسپند بر سطوح پلاسمایی هورمون‌های محور هیپوفیز–تیروئید در موش صحرایی نر بالغ بیان کردند که هارمالا که یکی از آلکالوئیدهای موجود در عصاره دانه گیاه اسپند می‌باشد دارای خاصیت مهارکنندگی برای آنزیم مونوآمینواکسیداز می‌باشد و با توجه به اینکه در صورت مهار این آنزیم سطوح

نوروترانسمیترهای کاته‌کول آمینی (دوپامین، نوراپی‌نفرین و اپی‌نفرین) و ایندل‌آمینی (سروتونین) افزایش می‌یابد و از آنجا که سروتونین به عنوان یک نوروترانسمیتر بازدارنده در ترشح هورمون آزادکننده تیروتروپین مطرح می‌باشد، لذا عصاره دانه گیاه اسپند با افزایش میزان سروتونین باعث کاهش ترشح هورمون آزادکننده تیروتروپین گردیده و به دنبال آن سطوح هورمون محرک تیروئید در پلاسما و متعاقبا هورمون‌های تیروکسین (T4) و تری‌یدوتیرونین (T3) کاهش می‌یابد(۷۱).

در یک مطالعه روغن پسته وحشی هورمون‌های تیروئیدی را در موش‌های صحرایی نر هیپوتیروئیدی افزایش داد، از اسانس روغنی پسته وحشی ترکیباتی همچون ترپینن، آلفاپینن، و لیمونن جدا گردیده و پیشنهاد شده که به دلیل وجود این ترکیبات روغنی غلظت هورمون‌های تیروئیدی افزایش یافته است(۷۲).

عصاره گیاه اسپند با مهار آنزیم مونوآمینو اکسیداز باعث افزایش میزان دوپامین می‌گردد که می‌تواند سطوح پلاسمایی هورمون‌های محور هورمونی هیپوفیز–تیروئید را کاهش دهد، دوپامین از طریق رسپتورهای D2 از ترشح هورمون محرک تیروئید از هیپوفیز قدامی جلوگیری می‌نماید، همچنین دوپامین با تحریک ترشح سوناتوستاتین نیز ترشح هورمون محرک تیروئید را کاهش می‌دهد و سطوح پلاسمایی هورمون‌های تیروکسین (T4) و تری‌یدوتیرونین (T3) نیز کاهش می‌یابد. همچنین ترکیبات استروئیدی موجود در عصاره دانه گیاه اسپند می‌تواند باعث کاهش پروتئین‌های انتقال‌دهنده هورمون‌های تیروئیدی در سرم شوند و در نهایت موجب کاهش هورمون‌های تیروکسین (T4) و تری‌یدوتیرونین (T3) شوند(۷۳).

در این مطالعه عصاره گردوی سیاه بر میزان HDL سرم خون موثر نبود در حالی عصاره گردو در گروه بدون تنش متی‌مازول موجب کاهش سطح LDL شد.

در مطالعه فلاحی و حسینی (۲۰۱۹) مشخص شد که عصاره برگ گردو در موش‌های دیابتی‌شده، باعث افزایش میزان سرمی HDL و کاهش میزان تری‌گلیسرید، کلسترول و LDL شد(۷٤). از مغز گردو برای افزایش لیپوپروتئین با وزن مولکولی بالا و کاهش لیپوپروتئین با وزن مولکولی پایین استفاده می‌شود(۷۵). عصاره گردوی سیاه در این مطالعه اثر بر میزان کلسترل سرم خون رت‌ها نداشت ولی بر تغییرات تری‌گلیسرید سرم خون موثر بود و موجب کاهش تری‌گلیسرید خون رت‌های تحت تنش با متی‌مازول شد.

اسیدکلروژنیک موجود در عصاره برگ گردو با دخالت غیرمستقیم در سنتز کلسترول و مهار آنزیم هیدروکسی متیل گلوتاریل کوآنزیم A ردوکتاز، سنتز آن را در هپاتوسیت‌های کبدی کاهش می‌دهد و باعث کاهش کلسترول اضافی از طریق افزایش دفع صفراوی آن می‌شود (۷٤).

در مطالعه جلودار و نظیفی (۲۰۰۱)، با مصرف عصاره اتری برگ درخت گردو غلظت کلسترل و تری‌گلیسرید به طور معنی‌داری کاهش یافت. آنها بیان کردند که ترکیبات شبه‌انسولینی موجود در عصاره‌های برگ درخت گردو، کلسترل و تری‌گلیسرید سرم را کاهش می‌دهند(۷٦).

۵-۲- نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد عصاره هیدروالکلی گردوی سیاه سبب کاهش میزان سرمی هورمون محرک تیروئید (TSH) و به تبع آن هورمون‌های تری یدوتیرونین (T3) و تیروکسین (T4) شد. از آنجا که فلاونوئیدها ، می‌توانند به صورت فیدبک منفی بر عملکرد محور هیپوتالاموس- هیپوفیز اثر بگذارد، لذا در این مطالعه عصاره گردوی سیاه احتمالا بخاطر وجود ترکیبات فلاونوئیدی، سبب کاهش میزان سرمی هورمون محرک تیروئید و هورمون‌های تیروئیدی شد.

۵-۳-پیشنهادات

۱- تعیین سطح GSH در گروه های استرسی و متی مازول

۲- بررسی پاتولوژی بافت تیروئید در پی القا متی مازول

۳- تاثیر عصاره هیدروالکلی برگ گیاه گردو بر غلظت آنزیم های کبدی و تغییرات بافتی کبد

٤- استفاده از دوزهای مختلف گردوی سیاه و روش های دریافت(خوراکی و تزریقی) و با مدت زمان طولانی تر.

۵- بررسی اثرات احتمالی عصاره هیدروالکلی برگ گیاه گردو بر بیماری های تیروئیدی

منابع

1.Arjmand, A., 2011, Translation of Medical Physiology, Guyton and Hall, Human Publications, pp. 1123-1239

2. Behtash, N., Fazelipour, S., Hadipour Jahromi, M., Tootian, Z., Chegini, HR, Asadi, F., Shafiei, M., 2011, Histology and histometry and serum levels of thyroid hormones subsequently Chronic nicotine use in mice, Journal of Islamic Azad University, Volume 21, pp. 268-274

3.Maurya AK, Tripathi S, Ahmed Z, Sahu RK.Antidiabetic and antihyperlipidemic effect of *Euphorbia hirta* in Streptozotocin induced diabetic rats. *Scholars Res Library* 2012; 4(2): 703-7.

4. Imanizadeh, Sina, 2020, Study of sexual dysfunction in men and women with hypothyroidism and hyperthyroidism before and after treatment, 20th Annual Research Congress of Medical Students, Kermanshah ,,, https://civilica.com/ doc / 944394

5.Martinez-Frias, M. L., Cereijo, A., R odriguez-Pinilla, E., Urioste, M., The lancet, 1992 , 339, 742-743.

Delnavaz Hashemlovian, B., Ataiee Azimi, A., 2009, Medicinal and edible 6.properties of plants with emphasis on Saveh plants, Islamic Azad University Publishing Institute, Saveh Branch, pp. 48-49

7.Rajhan, MS, 2005, Medical Histology, Volume II, Bashar Publications, pp. 486-491

8. Zargari, A., 2009, Medicinal plants, Volume 4, University of Tehran Publishing Institute, pp. 408-418.

9. Rezaei, S., Armi, S. M., Jafari, M., Khamiri, H. And Bayat, A. 2013. Comparison of antioxidant properties of walnut leaf extract of Toserkani variety obtained from two methods of solvent submerged extraction and microwave extraction. Journal of Food Industry Research, 1 (22): 17-3.

10. Mir Haidar, Hussein 1395. Plant mystic: The use of plants in the prevention and treatment of diseases. Tehran: Islamic Culture Publishing House. J. 1 p. 447- 2

11.Fathiazad, F., Garjani, A., Motavallian, Naini, A. 2006. Study of hypoglycemic activity of the hydroalcholic extract of juglans regia in normal and diabetic rats. Pharmaceutical Sci; 2: 13-7.

12.Asgary, S., Parkhideh, S., Solhpour, S., Madani, H., Mahzouni, P., Rahimi, P. 2008. Effect of ethanolic extract of Juglans regia L. on blood sugar in diabetes-induced rats. J Med Food; 11: 533-8.

13.Carvalho M., Ferreira, P. J, Mendes, V. S., Silva, R., Pereira, J. A., Jeronimo, C. 2010. Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of Juglans regia L. Food Chem Toxicol, 48: 441–447.

14.Dzhafarova, R. E., Garaev, G. Sh., Dzhafarkulieva, Z. S. 2009. Antidiabetic action of extract of juglans regia L. Georgian Med News; 170: 110-4

15.Wei, Q., Ma, X. and Dong, J. 2010. Preparation, chemical constituents15: 33-136

16.Kumaran, A. and Karunakaran, R. J. 2006. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of Coleus aromaticus.Food Chemistry. 97:109-114.

17.Pereira, J. A., Oliveira, I., Sousa, A., Valento, P., Andrade, P. B., Ferreira, I. C., F. R., Ferreres, F., Bento, A., Seabra, R. and Estevinho, L. 2007. Walnut (Juglans regiaL) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. Food and Chemical Toxicology, 45(11), 2287-2295.

18-Ago Y, Nakmura S, Baba A, Matsud T, Sulpiride in combination With fluvoxamine increases I vivo dopamine release selectivity in rat prefrontal cortex, neuropsy chopharmacology. (2010). 30, 43-51.

19-Ahmadi H, Determination of rutin and quercetin in plants by capillary electrophoresis with electrochemical detection,Fetoterapia. (2009). 67, 182-183.

20-Almeide RG, Florio JC, Spinosa HS, Bernadi MM, Compartive effect on maternal prenatal and postnatal exposure to astemizole on reproductive parameters of rats.Neurotoxical Teratol. (2009). 24, 255-265.

21-Anunciacion L, Nuria M, Perez L, Pazo and Ana I, Cadmium effect on Hypothalamic-Pituitary-Testicular Axis in Male Rats, Experimental Biology and Medicine. (2011). 226, 605-611.

22-Araki K, Arai Ky, Watanabe G, Taya K, Involvement of inhibin in the regulation of follicle-stimulating hormone secretion in young adault male shiba goat, J Androl. (2010). 21, 528-565.

23- Benczerowski P,Csaba Z, Cseruns,V.Gerendai,E.Lesion of the insular cortex effects luteinizining hormone and testosterone secretion of rat. Lateralized effect, J Brain Res. (2008). 906, 25-30

24-Berne RM, Levy M.N. Endocrine physiology. (1998). 67,910-948

25-Berne R, Matthew M, Levey N, Bruce M, Bruce A, Physiology Section, The endocrine system, The reproductive glands. (2010). 24, 920- 976

26-Berrougui H, Martin –cordero C, Khalil A, Hmamouchi M, Ettaib A, Marhauend AE,et al. Vasorelaxation effece of harmine and harmaline extract from Peganum harmaLa L. Pharmaco Logical Research. (2006). 54, 150-157.

27-Boelen A, Kwakkel J, Vos X, Wiersinga W, Fliers E, Differential effects of leptin and refeeding on the fasting-induced decrease of pituitary type 2 deiodinase and thyroid hormone receptor β2 mRNA expression in mice. J endocrinology. (2006). 190,537-544.

28-Bown D, Encyclopedia of herbs& Their uses. Dorling Kindersley. (2010). 48, 18-35.

29-Breen & Levy. Text book of physiology, chapter 46. (2010). 65, 145-163.

30-Castrol IA,Barroso LP,Sinnecker P,Functional food for coronary heart disease risk reduction a meta analysis using amultivariate approach. (2001). 82, 32-40.

31-Changizi Ashtiyani S, Zarei A, Taheri S, Rasekh F, Comparison between effects of different doses of Melissa officinalis and atorvastatin on the activity of liver enzymes in hypercholesterolemia rats. (2013). 25, 1-9.

32-Chethan P.S, Murugananthan G, Komaleeswari K, Evaluation of Antimicrobial Activity of Methanolic Exteract Fractions of Delonix Elata BRK. (2010). 80,10-14.

33-Cho JS, Kang TS, Kwack SJ, Ha DT, Ngoc TM,Hum TM,Thuong PT,Antioxidant activities of coumarins from koream medicinal plants and their structure-activity relationships,College of Pharmacy, Chungnam Natioal Univercity, Daejeon. (2009). 14, 305-764.

34-Chrousos G.P, Torpy D.J, Gold P.W, Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications. Annals of Internal Medicine. (1998). 129, 229-240.

35-Cooper D.S, Kilbanski A, Chester Ridgway E. Dopamine modulation of TSH and its subunits: in vitro studies. Clinical Endocrinology. (2008).18(3), 265-275.

36-Da Silva RR, Hypocholestrolemic effect of naringin and rutin flavonoids Arch Latinoam Nutr. (2009). 51, 258-264.

37-Da Veiga M.C, De Jesus Oliveira K, Curty F, De Moura C.P, Thyroid hormones modulate the endocrine and autocrine/paracrine actions of leptin on thyrotropin secretion. Journal of endocrinology. (2004). 183, 243-247.

38-David S , hormone glassorry:The basic brain hormones. (2009). 14, 35-58.

39-Denis C, Endringer keller G, Guimaraes Tamara p, kondratyuk j M, pezzuto and fernao C, Selective inhibition of Aromatase by a Dihydroiso coumarin from xyris ptery goblephra, J Nat Prod. (2009).71(6), 1082-1084.

40-D. Kretser David M, Januray General structure of the male reproductive system, Endocrinology of the male reproductive system. (2010). 58, 422-456.

41-Elizabeth S, Effect of selection for testosterone production on testicular morphology and daily sperm production in pigs. (1996). 82(3), 2259-2263.

42.S. J. Hadjileontiadou, Fuzzy Logic-Based Modeling in Collaborative and Blended Learning, IGI Global, 2015.

43.S. Melmed, Williams Textbook of Endocrinology, Elsevier Health Sciences, 2011.

44.D. L. Kasper, Harrison's Principles of Internal Medicine, New York Chicago San Francisco Athens London Madrid Mexico City: McGraw Hill Professional, 2015.

45.V. T. Peeters RP, "Metabolism of Thyroid Hormone," South Dartmouth, 2017.

46.D. Springer, A New Look At Hypothyroidism, younes, 2013.

47.D. L. Nelson, Lehninger Principles of Biochemistry: 6th Edition, Macmillan Learning, 2012.

48.E. Fliers, "The classic pathways of thyroid hormone metabolism," Elsevier, pp. 1-10, 2017.

49.C. C. Ewart Carson, Modeling Methodology for Physiology and Medicine, London: Elsevier, 2017.

50.P. Khanale, "A Fuzzy Inference System for Diagnosis of Hypothyroidism," Journal of Artificial Intelligence, vol. 4, no. 1, pp. 45-54, 2011 .

51.F. S. J. J. D. I. Marisa C. Eisenberg, "TSH Regulation Dynamics in Central and Extreme Primary Hypothyroidism," THYROID, vol. 20, no. 11, p. 1215–1228, 2010 .

52. Adeli Behrouz Hamidreza, Parivar Kazem, Amiri Iraj, Hayati Rudbari Nasim. The effect of methimazole-induced hypothyroidism on fertility in female mice. Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences. 2019. 6 (3): 37-47

53. Habibpour, Sara, Mokhtari, Mokhtar, Sharifi, Esfandiar. (2015). The effect of aqueous alcoholic extract of walnut leaf on hematological parameters in male rats with hypothyroidism. Journal of Animal Biology, 6 (3), 13-23.

54. Hashemi Seyedeh Sara, Gholam Ali, Rafati Alireza. The effect of fluoxetine on thyroid hormones and cortisol in rats. Journal of Arak University of Medical Sciences. 2015. 17 (2): 82-89

55. Mohammadi, Jamshid Mirzaei, Ali Azizi, Arsalan. Roozbehi, Amrullah, hamdolah delaviz.2014. The effect of hydroalcoholic extract of walnut leaf on pancreatic tissue changes in diabetic and normal rats. Journal of Southern Medicine, Fifteenth Year, No. 4, pp. 302-293.

56. Yousef Vand Namdar, Mohammadizadeh Ismail, Kazemi Maryam, Yavari Fereydoun, Dezfulinejad Saeed. The effect of methimazole-induced hypothyroidism on the levels of trace elements copper and zinc in the serum of white rats. Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2013; 20 (4): 107-116

57. Mohammadizadeh, Esmaeil, 2011, Scientific-research article entitled The effect of methimazole-induced hypothyroidism on lutein, testosterone, testicular and thyroid weight in rats, Department of Biology, Faculty of Science, Razi University, Kermanshah And Pharmacology, Volume 18, Number 67.

58. Akhi Azra, Kashi Zahra, Sharifpour Ali, Zakeri Hamidreza, Torabizadeh Jila. The effect of levothyroxine on respiratory function in patients with overt hypothyroidism. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences . 2009; 18 (67): 1-6

59. Manisha A, Roshan K M, Sudeep K, Imran M, Sumesh P S. Study of Trace Elements in Patients of Hypothyroidism with Special Reference to Zinc and Copper. Biomed J Sci&Tech Res 6(2)-2018. BJSTR. MS.ID.001336. DOI: 10.26717/ BJSTR.2018.06.001336.

60. Rezaei Armi, Somayeh, Seyed Mehdi Jafari, Morteza Khamiri and Hooman Bayat, 2012, Comparison of antioxidant properties of walnut leaf extract of Tuyserkani variety obtained by two methods of solvent extraction with extraction and microwave extraction, Journal of Food Science and Industry Research, Iran (2)), 219-234

61. Vahidi Irisfoli, Nazila,, Yada Hojjati, Mohammad Reza Yazdian, Morteza Zandedel, Hooman Shajiei, 2009, Investigation of the effects of walnut leaf extract in the prevention of molecular, tissue and enzymatic changes induced by ccl4 in chick liver, Developmental Biology, 11 (2), 33-34.

62. Sarvaghdi, Dr. Farzaneh, Dr. Mehdi Hedayati, Dr. Yadaleh Mehrabi and Dr. Fereydoon Azizi, 2004. Evaluation of autoantibodies, anti-peroxidase and anti-thyroglobulin,

sonographic manifestations and changes in thyroid volume in patients with permanent hypothyroidism up to 5 years after typhoid fever. Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism, Bi-Quarterly Journal of Endocrine and Metabolism Research Center, 6 (3), 213-218.

63.Ismaili, Amir Hossein. (2013). Collection of biochemical experiments (general and clinical). Imams Publications, 284 p.

64.Agharanya JC. Clinical usefulness of ELISA technique in the assessment of thyroid function. West Afr J Med 1990; 9 (4):258-63.

65.Faam B, Daneshpour M S, Salehi M, Hedayati M, Azizi F. Thyroid Peroxidase Gene Polymorphisms and Anti-TPO level in Tehranian adults. RJMS. 2012; 19 (95) :10-16

66. Batabyal SK, Das AK. Auto-antibodies to thyroid peroxidase in patients with thyroid diseases. Indian J Nucl Med. 2005; 11 (3): 134-36.

67. Mariotti S, Caturegli P, Piccolo P, Barbesino G, Pinchera A. Antithyroid peroxidase auto antibodies in thyroid diseases. J Clin Endocrinol Metab. 2007; 71 (3): 661-69

68. Azar Newshan Forough, Karami Maryam, Gholizadeh Lida, Judge of Cyrus. The effect of hydroalcoholic extract of Dorema aucheri on thyroid hormones in adult male rats. Journal of Shahrekord University of Medical Sciences. 2011; 12 (2): 76-83

69. Abbasi, Fatemeh, Yousef Vand, Namdar (2017). The effect of thymoquinone and black seed hydroalcoholic extract on hypothyroidism in male rats. Master Thesis, Faculty of Basic Sciences, Razi University of Kermanshah.

70. Mirazi, Nasser and Abdolmaleki, Nasrin and Mahmoudi, Minoo, 2012, The effect of hydroalcoholic extract of sage on serum levels of thyroid hormones in male hypothyroidism rats ,,,,, https://civilica.com/doc / 570412

71. Seyyed Ibrahim Hosseini, Hibatullah Sadeghi, Amineh Daneshi, (2009). The effects of aqueous alcoholic extract of Pecan seed on plasma levels of pituitary thyroid hormones in adult male rats, Armaghan Danesh Journal, 14 (4), 23.

72. Beizai, Azadeh, 2008, The effect of oral consumption of wild pistachio oil (coriander) on serum leptin and thyroid hormones in male rats, 15th Iranian Veterinary Congress, Tehran.

73. Moharramifard Majid, Mohammad Aini Ali, Vahidi Nazila, Ahmadifar Mehdi, Kalhor Nasser, Gholam Babaian Mohammad Mehdi. Evaluation of the effects of hydroalcoholic extract of Pecan on serum levels of thyroid serum parameters and histopathological

changes of the thyroid gland in female rats. Scientific Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd. 2016. 23 (3): 1987-1993

74. Fallahi, Marzieh and Seyed Ibrahim Hosseini, 2019, The effect of walnut leaf extract with forced swimming stress on lipid profile and body weight in adult male diabetic rats, Journal of Sabzevar University of Medical Sciences, 27 (3), 347 -353

75. Mokhtari, Mokhtar, Mahmoud Abedinzadeh and Seyedeh Narjes Naseran, 2012, The effect of alcoholic extract of walnut kernel on the concentration of follicle-stimulating hormones, luteinizers and testosterone in adult male rats, Journal of Ardabil University of Medical Sciences, 12-21, 157, 157

76. Jalodar, Gholam Ali, Saeed Nazifi, 2001, Study of the effect of walnut leaf extracts on some biochemical parameters of blood serum of diabetic rats, Journal of Veterinary Medicine, University of Tehran, 56 (3), 37-40

Abstract

Thyroid disorders are a relatively common disease worldwide. Due to the side effects of chemical drugs, this study was performed to evaluate the effect of hydroalcoholic extract of black walnut on the improvement of thyroid function in methimazole-induced hypothyroidism in adult male Wistar rats.

Materials and Methods: Experimental study with adult Wistar rats in the weight range of 20 200 200 and in five experimental groups of six (control, methimazole stress, walnut extract, methimazole stress with walnut extract and methimazole stress). Was performed with levothyroxine (N = 6). Blood parameters include Thyroid peroxidase antibody (Anti-TPO), Thyroid stimulating hormone (TSH), Thyroxine (T4), Triiodothyronine (T3), High-density lipoprotein (HDL), Low-lipid-lipid, and lipolyglutin (T). One-way analysis of variance (ANOVA) was used to investigate the significant effects of treatments on each of the measured variables. The means of treatment groups were compared with Tukey test.

The results of these studies showed that the hydroalcoholic extract of black walnut reduced the serum levels of thyroid stimulating hormone (TSH) and consequently the hormones triiodothyronine (T3) and thyroxine (T4). Therefore, in this study, black walnut extract, due to its abundant flavonoid compounds, reduces the serum levels of thyroid-stimulating hormone and thyroid hormones and improves thyroid function under hypothyroidism.

Keywords: Black walnut extract, Hypothyroidism, T3 and T4 hormones, Methimazole