



## تأثیر عصاره آبی الکلی برگ گردو بر شاخص‌های هماتولوژیک در موش صحرایی نر مبتلا به کم‌کاری تیروئید

سارا حبیب‌پور، مختار مختاری\*، اسفندیار شریفی

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، گروه زیست‌شناسی، کازرون، ایران

مسئول مکاتبات: Mokhtar\_mokhtary@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۸

تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۱۲

### چکیده

هایپوتیروئیدیسم از جمله بیماری‌های انسانی است که در نتیجه اختلالات خود ایمنی و کمبود ید در رژیم غذایی روزانه افراد بوجود می‌آید. در این تحقیق اثر عصاره آبی الکلی برگ گردو بر شاخص‌های هماتولوژیک در موش صحرایی نر مبتلا به کم‌کاری تیروئید مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش از ۶۰ سر موش صحرایی نر بالغ، با وزن تقریبی ۲۲۰-۲۰۰ گرم استفاده شد که به شش گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. گروه کنترل بدون هیچ تیمار دارویی، گروه شاهد که حلال عصاره دریافت کرد. گروه تجربی ۱، کم‌کاری تیروئید که داروی متی‌مازول بصورت گاوآژ به مدت ۱۰ روز دریافت کرد. گروه تجربی ۲، تیمار شده با عصاره برگ گردو به میزان ۱۵۰۰ (mg/kg)، گروه تجربی ۳ و ۴ که علاوه بر القای هایپوتیروئیدیسم به ترتیب و روزانه ۱۵۰۰ و ۷۵۰ عصاره برگ گردو را بصورت خوراکی و به مدت ۴ هفته دریافت کردند و شاخص‌های هماتولوژیک شامل گلبول‌های قرمزوسفید، نوتروفیل، لنفوسیت، مونوسیت، ائوزینوفیل، بازوفیل، پلاکت، هماتوکریت، هموگلوبین، MCH، MCV و اندازه‌گیری شد. نتایج با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس ANOVA و نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت ( $P < 0/05$ ). بر اساس نتایج آماری بدست آمده از این تحقیق در گروه تجربی ۱، تعداد گلبول قرمز، هموگلوبین، پلاکت، لنفوسیت، MCH، MCV نسبت به گروه کنترل و شاهد کاهش و ائوزینوفیل افزایش معنی‌داری را نشان داده است. در گروه‌های تجربی ۳ و ۴ نسبت به گروه تجربی ۱، تعداد گلبول قرمز، هموگلوبین و پلاکت افزایش و ائوزینوفیل کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد. براساس نتایج این تحقیق و مطالعات سایر محققان، احتمالاً عصاره آبی الکلی برگ گردو باعث داشتن ترکیبات فلاونوئیدی و پلی‌فنلی که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند، گلبول‌های قرمز و هموگلوبین را در برابر آسیب‌های اکسیدانی محافظت می‌کند و باعث کاهش تعداد ائوزینوفیل‌ها نیز می‌گردد و تجمع و چسبندگی پلاکت‌ها را مهار و تعداد پلاکت را در افراد مبتلا به هایپوتیروئید افزایش می‌دهد.

کلمات کلیدی: برگ گردو، هایپوتیروئیدیسم، شاخص‌های هماتولوژیک، رت

### مقدمه

آید. میزان شیوع آن از ۱/۳٪ تا ۱۷/۵٪ است و وابسته به سن، جنس و میزان جذب ید می‌باشد (۴۰، ۳). هورمون‌های تیروئیدی نقش حیاتی در تمایز، رشد، متابولیسم و عملکردهای فیزیولوژیکی در تمام بافت‌های بدن دارند [۳۷]. این هورمون‌ها بصورت مستقیم یا غیرمستقیم، بواسطه

هایپوتیروئیدیسم یک سندرم بالینی است که به علت کمبود هورمون‌های تیروئیدی ایجاد می‌گردد. از لحاظ کلینیکی، هایپوتیروئیدیسم بصورت افزایش در غلظت سرمی هورمون محرکه تیروئید (TSH) که در ارتباط با غلظت تری-یدوتیرونین (T<sub>4</sub>) و تیروکسین (T<sub>3</sub>) آزاد است، بوجود می-



اریتروپوئیتین رشد کلونی‌های اریتروئید (BFU-E و CFU-E) را تحریک می‌کند و به همین دلیل کاهش میزان اریتروپوئیتین باعث ایجاد آنمی در افراد مبتلا به هایپوتیروئید می‌شود [۱۷، ۱]. با توجه به اطلاعات سازمان جهانی بهداشت درصد کم خونی در جهان و در کشورهای در حال توسعه افزایش یافته است. هم‌اکنون گیاهان نقش مهمی در سلامت جامعه و ارزش زیادی در توسعه صنعت دارویی دارند و می‌توانند در درمان کم خونی موثر باشند [۱۱، ۱۲]. گردو (*Juglans regia* L.) شایع‌ترین درخت میوه‌دار در جهان است. عموماً این درخت را به نام‌های گردوی ایرانی، گردوی سفید، گردوی انگلیسی یا گردو می‌خوانند که متعلق به خانواده *Juglandacea* با نام علمی *Juglans regia* می‌باشد. گردو یکی از گیاهان دارویی است که به‌طور سنتی برای درمان برخی از بیماری‌ها نظیر معده درد، آسم، آگزما، بیماری‌های پوستی، سینوزیت، بیماری‌های آندوکرینی، بیماری‌های عفونی و انگلی مورد استفاده قرار می‌گیرد. ترکیبات موجود در آن دارای خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی نیز می‌باشد [۷، ۲۸، ۳۵].

نفتاکینون‌ها و فلاونوئیدها ترکیبات اصلی فنولی موجود در برگ گردو محسوب می‌شوند. انواع فلاونوئید در برگ گردو شامل ریوتین، مریستین، کوئرستین و ژوگلون می‌باشد [۱۰، ۳۰، ۳۳]. در فلاونوئیدها فعالیت‌های ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی، ضد آلرژیکی، محافظت‌کننده کبدی، آنتی‌ترومبیک و ضد ویروسی تشخیص داده شده است.

فلاونوئیدها یک نظم قابل توجه‌ای در فعالیت‌های بیوشیمیایی و فارماکولوژیکی نشان می‌دهند که دارای اثر معنی‌داری بر عملکرد سیستم سلولی انواع پستانداران دارد [۲۶]. تحقیقات *Kukongviriyapan* و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان می‌دهد آنتی‌اکسیدان‌ها، گلبول‌های قرمز خون را در برابر آسیب‌های اکسیدانی حمایت می‌کند. همچنین در گزارشات دیگر آمده است، حضور برخی آنتی-

اکسیدان‌های قوی با غلظت‌های مختلف می‌تواند در مهار همولیز گلبول‌های قرمز خون از طریق پراکسیداز هیدروژن مؤثر باشد [۲۲]. مطالعات *Wills* و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان می‌دهد، کوئرستین لنفوسیت‌ها را در برابر آسیب‌های ناشی از مواد شیمیایی محافظت می‌کند و می‌تواند آنتی‌اکسیدان پلاسما را افزایش دهد [۳۶]. ترکیبات پلی‌فنلی خصوصاً فلاونوئیدها موجود در برگ گردو دارای اثر حفاظتی در برابر آسیب‌های ناشی از سموم کبدی و رادیکال‌های آزاد است [۲، ۴]. مطالعات *Elliott* و *Middleton* و همکاران در سال ۲۰۰۰ نشان می‌دهد فلاونوئیدها قادرند آزادسازی هیستامین و سیتوکین‌ها از ماست سل‌ها را کاهش دهند و با تولید کمک‌کننده‌های T نوع ۲ (TH2) سیتوکین را از طریق فعال کردن بازوفیل‌ها مهار کنند [۲۶، ۳۱، ۳۲].

با توجه به شیوع بیماری هایپوتیروئیدسم در جوامع امروزی و اهمیت هورمون‌های تیروئید بر عملکرد سیستم‌های ایمنی و خونساز بدن [۸] و همچنین عوارض زیاد داروهای شیمیایی، نیاز به داروهایی با حداقل عوارض و درجه اطمینان زیاد که بتوان از آنها برای مدت زمان طولانی استفاده کرد، وجود دارد. گیاهان دارویی از جمله مواد طبیعی هستند که عوارض جانبی آنها کمتر است و در طب سنتی از آن در درمان بیماری‌های مختلف استفاده می‌شده است. با توجه به این که تاکنون تأثیر عصاره برگ گردو بر روی شاخص‌های هماتولوژیک (گلبول‌های قرمز و سفید، لنفوسیت، مونوسیت، بازوفیل، ائوزینوفیل، نوتروفیل، هموگلوبین، هماتوکریت، *MCH*، *MCHC*، *MCV*) به دنبال القای هایپوتیروئیدسم مورد بررسی و مطالعه قرار نگرفته است، این تحقیق انجام شده است.



## مواد و روش کار

در این مطالعه تجربی حیوانات مورد استفاده ۶۰ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار (Wistar) در محدوده وزنی ۲۲۰-۲۰۰ گرم و محدوده سنی ۳-۲/۵ ماه بودند که از خانه پرورش حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون تهیه و به محل انجام آزمایش منتقل گردید. حیوانات بصورت تصادفی در شش گروه ده‌تایی تا زمان انجام آزمایش در قفس‌های استاندارد و تحت شرایط یکسان با دمای  $23 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و با چرخه نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در حیوانخانه‌ی گروه زیست‌شناسی نگهداری شدند. به منظور سازش حیوانات با محیط تمامی آزمایش‌ها ۱۰ روز پس از استقرار موش‌های صحرایی انجام شد. آب و غذا به میزان کافی در اختیار آنها قرار گرفت و به جز در زمان انجام آزمایش، به راحتی به آب و غذا دسترسی داشتند. قوانین اخلاقی مربوط به نگهداری و کار با حیوانات آزمایشگاهی در همه‌ی مراحل آزمایش رعایت شد [۲۱، ۳۸]. برای هایپوتیروئید کردن موش‌ها از داروی متی‌مازول بصورت تک دوز و بصورت خوراکی با روش گاواژ و به میزان ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم حل شده در ۱ میلی‌لیتر آب مقطر استفاده گردید [۱۳]. برای اطمینان از هایپوتیروئید شدن حیوانات ۱۰ روز بعد از تجویز دارو از دم موش‌ها خون‌گیری به عمل آمد و غلظت هورمون‌های تیروئیدی تیروکسین ( $T_3$ ) و تری‌یدوتیرونین ( $T_4$ ) در سرم خون آنها توسط دستگاه ELISA Reader در بیمارستان قلب الزهراء شیراز اندازه‌گیری و میزان این هورمون‌ها نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد مقایسه گردید و هایپوتیروئیدیسم شدن تایید گردید (جدول ۱).

برای تهیه عصاره آبی-الکلی برگ گردو، ابتدا مقداری برگ گردو را در سایه خشک کرده و بعد از خشک شدن برگ گردو، آن را در آسیاب برقی ریخته تا پودر شود. پودر

خشک شده را با الکل اتانول ۹۶٪ و آب مقطر به نسبت ۵۰/۵۰ مدت ۷۲ ساعت خیسانده و در طی این مدت چندین بار ظرف را تکان می‌دهیم. سپس آن را صاف کرده و عصاره آبی الکلی بدست آمده را در لوله آزمایش ریخته و در دستگاه سانتریفوژ با سرعت ۴۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۸ دقیقه قرار داده شد تا ذرات معلق آن جدا شود. بعد از سانتریفوژ مایع بدست آمده را در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرارداده تا شیره غلیظی باقی بماند. در مرحله بعد مقادیر مورد نظر از عصاره در آب مقطر حل شد تا غلظت‌های مختلف بدست آید [۱۵].

**گروه‌بندی حیوانات:** برای توزین حیوانات در گروه‌های مورد مطالعه سعی شد، اختلاف وزن حیوانات در گروه‌ها ( $10 \pm$  گرم) تعیین شود و در ادامه آنها به ۶ گروه ده‌تایی به شرح زیر تقسیم شدند:

گروه کنترل: شامل ۱۰ سر موش صحرایی نر بود و در طول دوره تیمار فقط آب و غذای فشرده استفاده کرد و هیچ‌گونه حلال یا دارویی دریافت نکردند.

گروه شاهد: ۱۰ سر موش صحرایی نر و دریافت کننده فقط آب مقطر با حجمی معادل حلال بودند.

گروه تجربی ۱: ۱۰ سر موش صحرایی نر و دریافت کننده ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم داروی متی‌مازول بصورت گاواژ بود.

گروه تجربی ۲: ۱۰ سر موش صحرایی نر و دریافت کننده فقط عصاره برگ گردو به میزان ۱۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه و بصورت گاواژ بود.

گروه تجربی ۳: ۱۰ سر موش صحرایی نر و دریافت کننده ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم داروی متی‌مازول به مدت ۱۰ روز و عصاره برگ گردو به میزان ۷۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه و بصورت گاواژ به مدت ۲۸ روز بود.



گروه تجربی ۴: ۱۰ سر موش صحرایی نر که دریافت کننده ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم داروی متی مازول به مدت ۱۰ روز و عصاره برگ گردو به میزان ۱۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم روزانه به مدت ۲۸ روز بصورت گاواژ بود.

بعد از ۲۸ روز تحت تأثیر بیهوشی خفیف با اتر از قلب خونگیری به عمل آمد. قبل از خونگیری ۶۰ شیشه استریل مخصوص نگهداری خون حاوی ۰/۵ میلی لیتر ماده ضد انعقاد خون آماده شد. پس از خونگیری، نمونه های خونی بلافاصله و با احتیاط بروی دیواره داخلی شیشه های مذکور ریخته و به آرامی با ماده ضد انعقاد مخلوط گردید. سپس شیشه های مورد نظر را در جعبه ای مخصوص محتوی یخ قرار داده و جهت انجام مراحل آزمایش به آزمایشگاه منتقل شدند. از دستگاه Cell counter شرکت Minbray برای اندازه گیری شاخص های خونی استفاده شد. دقت دستگاه صد در صد می باشد و مدت زمانی که خون در دستگاه قرار داده می شود حداکثر ۲ دقیقه می باشد. شمارش گلبول های قرمز و سفید بوسیله دستگاه و افتراق گلبول های سفید به روش دستی و Diff انجام گرفت.

به منظور تحلیل داده ها در این تحقیق از نرم افزار SPSS استفاده شد، برای مقایسه گروه ها و برای تعیین اثر تیمار بر گروه ها از آزمون آماری ANOVA یک طرفه و به دنبال آن تست Tukey برای آزمون تفاوت بین گروه ها استفاده شد. با استفاده از نرم افزار Excel نمودارهای مربوطه ترسیم گردید و در کلیه یافته ها  $P < 0/05$  به عنوان مرز معنی دار بودن از لحاظ آماری در نظر گرفته شد. داده ها بصورت  $Mean \pm SEM$  ارائه شد.

## نتایج

نتایج بدست آمده به دنبال تأثیر عصاره آبی- الکلی برگ گردو بین گروه های تجربی، کنترل و شاهد به همراه

محاسبات آماری بصورت جداول ارائه شده است. تجزیه و تحلیل آماری نتایج نشان داد میزان MCH، MCHC و درصد لنفوسیت در گروه هایپوتیروئیدیسم نسبت به گروه های کنترل و شاهد در سطح  $P < 0/05$  کاهش معنی داری را نشان می دهد. میزان MCH، MCHC و درصد لنفوسیت-ها در گروه های تجربی ۲ (عصاره برگ گردو)، ۳ و ۴ (عصاره برگ گردو+ هایپوتیروئیدیسم) با مقادیر ۱۵۰۰ و ۷۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم در پایان روز ۲۸ نسبت به گروه هایپوتیروئیدیسم، کنترل و شاهد اختلاف معنی داری را در سطح  $P < 0/05$  نشان ندادند (جدول ۲ و ۳).

**اثر عصاره آبی الکلی برگ گردو بر میانگین هموگلوبین خون:** نتایج بدست آمده از میانگین میزان هموگلوبین خون در گروه های کنترل، شاهد و گروه تجربی ۲ دریافت کننده فقط عصاره برگ گردو به ترتیب  $13/93 \pm 0/22$  و  $13/54 \pm 0/22$  گرم در دسی لیتر و در گروه های هایپوتیروئیدیسم، تجربی ۳ و ۴ (عصاره برگ گردو+ هایپوتیروئیدیسم) با مقادیر ۱۵۰۰ و ۷۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم به ترتیب  $12/36 \pm 0/50$  و  $14/11 \pm 0/20$ ،  $13/74 \pm 0/27$  گرم در دسی لیتر بود. نتایج حاصل از اندازه گیری میزان هموگلوبین خون نشان داد سطح هموگلوبین خون در گروه هایپوتیروئیدیسم در مقایسه با گروه کنترل و شاهد کاهش معنی داری را نشان داد ( $P < 0/05$ ). در گروه های تجربی ۳ و ۴ میزان هموگلوبین نسبت به گروه هایپوتیروئیدیسم بصورت معنی داری افزایش یافت ( $P < 0/05$ ) (جدول ۲).

**اثر عصاره آبی الکلی برگ گردو بر تعداد گلبول های قرمز خون:** میانگین تعداد گلبول های قرمز خون در گروه های کنترل، شاهد و هایپوتیروئیدیسم به ترتیب  $7/46 \pm 0/10$ ،  $7/60 \pm 0/09$  و  $6/88 \pm 0/19$  میلی گرم در دسی لیتر و در گروه های تجربی ۳ و ۴ (عصاره برگ گردو+)



اثر عصاره آبی الکلی برگ گردو بر تعداد ائوزینوفیل خون میانگین تعداد ائوزینوفیل خون در گروه‌های کنترل، شاهد و هایپوتیروئیدیسم به ترتیب  $1/19 \pm 0/3$ ،  $1/12 \pm 0/29$  و  $1/27 \pm 0/27$  و میانگین تعداد ائوزینوفیل در گروه تجربی ۲ (عصاره برگ گردو)، ۳ و ۴ (عصاره برگ گردو + هایپوتیروئیدیسم) با مقادیر ۱۵۰۰ و ۷۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به ترتیب با میانگین‌های  $0/12 \pm 0/12$ ،  $0/12 \pm 0/12$  و  $0/21 \pm 0/05$  بود. اختلاف میانگین تعداد ائوزینوفیل خون در گروه هایپوتیروئیدیسم نسبت به گروه کنترل و شاهد در سطح  $P \leq 0/05$  اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. میانگین تعداد ائوزینوفیل در گروه تجربی ۲، ۳ و ۴ در مقایسه با گروه هایپوتیروئیدیسم و همچنین کنترل و شاهد کاهش معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0/05$ ) (جدول ۳).

اختلاف معنی‌داری در تعداد کل گلبول‌های سفید خون، درصد لنفوسیت‌ها، مونوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها، بازوفیل‌ها، هماتوکریت، MCV، MCH، MCHC بین گروه‌های تجربی ۳ و ۴ نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد مشاهده نشد.

هایپوتیروئیدیسم) با مقادیر (mg/kg) ۱۵۰ و ۷۵۰ به ترتیب  $0/11 \pm 0/12$ ،  $0/12 \pm 0/12$  میلی‌گرم در دسی‌لیتر بود. اختلاف میانگین تعداد گلبول قرمز خون در گروه هایپوتیروئیدیسم نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد کاهش معنی‌دار ( $P < 0/05$ ) و در گروه‌های تجربی ۳ و ۴ در مقایسه با گروه هایپوتیروئیدیسم افزایش معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0/05$ ) (جدول ۲).

اثر عصاره آبی الکلی برگ گردو بر تعداد پلاکت خون: میانگین تعداد پلاکت خون در گروه‌های کنترل، شاهد و هایپوتیروئیدیسم به ترتیب  $25/74 \pm 6/3$ ،  $19/54 \pm 7/4$  و  $7/4/5$  و  $21/25 \pm 6/2$  و در گروه‌های تجربی ۳ و ۴ (عصاره برگ گردو + هایپوتیروئیدیسم) با مقادیر ۱۵۰۰ و ۷۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به ترتیب  $31/37 \pm 7/4$  و  $11/27 \pm 7/3$  بود. اختلاف میانگین تعداد پلاکت خون در گروه هایپوتیروئیدیسم نسبت به گروه کنترل و شاهد کاهش معنی‌دار ( $P < 0/05$ ) و در گروه‌های تجربی ۳ و ۴ در مقایسه با گروه هایپوتیروئیدیسم افزایش معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0/05$ ) (جدول ۲).

جدول ۱- مقایسه میانگین غلظت سرمی هورمون تری‌یدوتیرونین (T4) و تیروکسین (T3) بین گروه‌های هایپوتیروئیدیسم، کنترل و شاهد

گروه های آزمایش	میزان هورمون T4 (µg/dl) (Mean±SEM)	میزان هورمون T3 (ng/ml)
کنترل	$3/6 \pm 0/17$	$1/2 \pm 0/15$
شاهد	$3/5 \pm 0/02$	$1/3 \pm 0/12$
هایپوتیروئیدیسم (متی‌مازول)	$0/2 \pm 0/04^*$	$0/6 \pm 0/02^*$

علامت ستاره (\*) در جدول نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های هایپوتیروئیدیسم، کنترل و شاهد می‌باشد. مقادیر بر اساس میانگین  $\pm$  خطای معیار میانگین (Mean  $\pm$  SEM) ارائه شده است.



جدول ۲- مقایسه میانگین شاخص‌های خونی بین گروه‌های تجربی، کنترل و شاهد در پایان دوره آزمایش

گروه‌های آزمایش	گلبول قرمز خون (mm <sup>3</sup> )	هموگلوبین (gr×dl)	هماتوکریت (L/L)	(gr×dl) MCHC	MCV (FL)	MCH(pg)
کنترل	۷/۴۶±۰/۱۰	۱۳/۵۶±۰/۱۴	۳۸/۷۸±۰/۶۱	۳۵/۴۲±۰/۱۵	۵۲/۱±۰/۴۱	۱۸/۳۷±۰/۱۷
شاهد	۷/۶۰±۰/۰۹	۱۳/۹۳±۰/۱۳	۳۹/۰۲±۰/۷۳	۳۵/۶۴±۰/۱۹	۵۱/۳±۰/۲۶	۱۸/۲۵±۰/۱۳
تجربی ۱ (هایپوتیروئیدیسم)	۶/۸۸±۰/۱۹*	۱۲/۳۶±۰/۵۰*	۳۷/۶۳±۱/۰۶	۳۴/۸۳±۰/۲۷*	۵۲/۴۹±۰/۶۷	۱۷/۶۳±۰/۱۷*
تجربی ۲ (عصاره برگ گردو به مقدار ۱۵۰۰ mg/kg)	۷/۴۹۳±۰/۱۳	۱۳/۵۴±۰/۲۲	۳۸/۴۸±۰/۷۳	۳۵/۱۵±۰/۱۳	۵۱/۳۸±۰/۶۷	۱۸/۰۲±۰/۲۱
تجربی ۳ (هایپوتیروئیدیسم + عصاره برگ گردو به مقدار ۷۵۰ mg/kg)	۷/۷۰±۰/۱۱**	۱۴/۱۱±۰/۲۰**	۳۹/۸۳±۰/۴۴	۳۵/۳۷±۰/۱۸	۵۱/۷±۰/۳۶	۱۸/۲۴±۰/۱۰
تجربی ۴ (هایپوتیروئیدیسم + عصاره برگ گردو به مقدار ۱۵۰۰ mg/kg)	۷/۶۸±۰/۱۲**	۱۳/۷۴±۰/۲۷**	۳۸/۷۶±۰/۷۰	۳۵/۳۸±۰/۱۰	۵۰/۵۲±۰/۴۵	۱۷/۸۴±۰/۱۹

علامت ستاره (\*) در جدول نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه تجربی ۱ با کنترل و شاهد می‌باشد و علامت (\*\*) نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های تجربی ۳ و تجربی ۴ با گروه تجربی ۱ می‌باشد. مقادیر بر اساس میانگین ± خطای معیار میانگین (Mean ± SEM) آورده شده است.

جدول ۳- مقایسه میانگین تعداد گلبول‌های سفید خون بین گروه‌های تجربی، کنترل و شاهد در پایان دوره آزمایش

گروه‌های آزمایش	پلاکت (تعداد در میلی‌لیتر)	گلبول سفید خون (میلی‌متر مکعب)	تعداد نوتروفیل (درصد)	تعداد مونوسیت (درصد)	تعداد لنفوسیت (درصد)	تعداد ائوزینوفیل (درصد)	تعداد بازوفیل (درصد)
کنترل	۶۹۴/۳±۲۵/۷۴	۶/۲±۰/۴۴	۳۶/۲±۱/۸۷	۲/۳±۰/۲۶	۶۰/۰۷±۱/۵۸	۱/۱۲±۰/۲۹	۰±۰
شاهد	۷۰۴/۵±۱۹/۵۴	۶/۷±۰/۷۶	۳۷/۳±۲/۸۹	۲/۳±۰/۲۳	۶۱/۳±۱/۷۲	۱/۱۹±۰/۳	۰±۰
تجربی ۱ (هایپوتیروئیدیسم)	۶۱۴/۲±۲۱/۲۵*	۷/۵±۰/۷۶	۳۷/۱±۶/۰۵	۲/۴±۰/۲۶	۵۳/۲±۳/۵۲*	۱/۲۹±۰/۲۷	۰±۰
تجربی ۲ (عصاره برگ گردو به مقدار ۱۵۰۰ mg/kg)	۷)±۲۱/۷۵	۷/۹±۰/۹۱	۳۳/۵±۲/۷۱	۲/۳±۰/۳	۶۱/۱±۳/۰۷	۰/۱۲±۰/۱۲*	۰/۱±۰/۱
تجربی ۳ (هایپوتیروئیدیسم + عصاره برگ گردو به مقدار ۷۵۰ mg/kg)	۷۶۷/۴±۳۱/۳۷**	۶±۱/۰۲	۴۰/۶±۴/۲۹	۲/۵±۰/۲	۵۷/۸±۴/۶۳	۰/۲۱±۰/۱۲**	۰±۰
تجربی ۴ (هایپوتیروئیدیسم + عصاره برگ گردو به مقدار ۱۵۰۰ mg/kg)	۷۰۳/۲±۱۱/۲۷**	۷/۷±۰/۷۸	۳۴/۷±۳/۷۳	۲/۶±۰/۲۲	۵۹/۶±۴/۵۰	۰/۱۵±۰/۰۵**	۰±۰

علامت ستاره (\*) در جدول نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه تجربی ۱ با کنترل و شاهد می‌باشد و علامت (\*\*) نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های تجربی ۳ و تجربی ۴ با گروه تجربی ۱ می‌باشد. مقادیر بر اساس میانگین ± خطای معیار میانگین (Mean ± SEM) آورده شده‌اند.



## بحث

های آزاد در محیط هستند که رادیکال‌های آزاد به غشا گلبول‌های قرمز حمله می‌کنند و باعث پراکسیداسیون لیپیدی و همولیز گلبول قرمز می‌شوند [۶، ۳۹]. با توجه به اتصال فلاونوئیدها به غشای گلبول‌های قرمز خون آنها می‌توانند بطور قابل توجهی پراکسیداسیون لیپیدی را مهار و از همولیز گلبول قرمز جلوگیری کنند [۶]. مطالعات نشان می‌دهد تجمع پلاکت از طریق آدنوزین دی‌فسفات در خون بیماران مبتلا به هایپوتیروئیدسم تحریک می‌شود [۲۵]. همچنین در افراد مبتلا به کم کاری تیروئید، تمایل به فعال شدن پلاکت افزایش می‌یابد و افزایش فعالیت پلاکت‌ها منجر به خطر ابتلا به عوارض آترو ترومبوتیک در افراد مبتلا به کم کاری تیروئید می‌گردد. سایر تحقیقات نشان می‌دهد چندین نوع فلاونوئید در عصاره برگ گردو بطور معنی‌دار بر چسبندگی، تجمع و ترشح پلاکت‌ها تأثیر دارد [۹، ۲۶]. برخی فلاونوئیدها شامل فلاون، کریسن، فلوریتین از تجمع پلاکت‌ها از طریق مهار مسیر سیکلو‌اکسیژناز جلوگیری می‌کنند. علاوه بر این فلاون، کریسن و آپی‌ژنین موجود در عصاره، سیکلیک آدنوزین مونوفسفات (cAMP) پلاکت را در پاسخ به پروستاگلین ۲ (PGI<sub>2</sub>) تحریک می‌کند. این اثر ممکن است از طریق مهار آدنیلات سیکلاز میانجی‌گری شود. اگرچه، میریستین و کوئرستین افزایش سیکلیک آدنوزین مونوفسفات (cAMP) را با افزایش پروستاگلین ۲ (PGI<sub>2</sub>) تحریک می‌کند. تعدیل مکانیسم سیکلیک آدنوزین مونوفسفات (cAMP) پلاکت فعالیت فسفودی استراز را مهار می‌کند که احتمالاً به عنوان یک مکانیسم با اثرات ضد تجمعی می‌باشد [۹، ۲۳].

Rutin موجود در عصاره برگ گردو فعالیت فسفولیپاز C را مهار می‌کند و به دنبال آن فعالیت پروتئین کیناز C و

ارتباط بین هایپوتیروئیدسم و کم خونی در بیماران مبتلا به آن مکرراً گزارش شده است [۲۴]. مطالعه حاضر نشان می‌دهد، درمان با عصاره آبی الکلی برگ گردو میزان کاهش یافته هموگلوبین و تعداد گلبول قرمز خون در موش‌های مبتلا به کم کاری تیروئید را افزایش می‌دهد. هورمون‌های تیروئیدی در افراد بالغ، کودکان و در دوران جنینی از طریق تأثیر بر فرایند هماتوپوئیتیک در سنتز هموگلوبین دخالت دارند. در افراد هایپوتیروئیدسم کمبود هورمون‌های تیروئیدی باعث ایجاد کم خونی می‌شود و فرایند متابولیسم اکسیژن کند می‌شود [۱۹]. برگ گردو حاوی آنتی‌اکسیدان‌هایی نظیر فلاونوئیدها می‌باشد که گروهی از ترکیبات پلی فنلی هستند [۲۷، ۱۸]. آهن در ساختمان هموگلوبین مسئول انتقال اکسیژن به بافت‌ها است [۱۴]. در بررسی‌ها اثر سودمند فلاونوئیدها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو بر هموگلوبین و سلول‌های قرمز خون که ناشی از هیدرو پراکسیداسیون است مطالعه شده است [۲۹، ۵]. یافته‌ها نشان می‌دهد فلاونوئیدهای آگریز در سیتوپلاسم اریتروسیت‌ها نفوذ می‌کند و در تعامل با هموگلوبین و اکسید آهن Heme هستند [۲۰]. فلاونوئیدها قادر به جلوگیری از تشکیل فریل هموگلوبین هستند، که در واکنش اکسی-هموگلوبین با پراکسید هیدروژن یا هیدروپراکسید آلی بوجود می‌آید. تحت شرایطی که فریل هموگلوبین تشکیل شده باشد، حضور فلاونوئیدها باعث جلوگیری از تبدیل نیمی از مولکول‌های اکسی هموگلوبین به مت‌هموگلوبین می‌شود که مت‌هموگلوبین نمی‌تواند اکسیژن را به بافت منتقل کند [۱۶، ۱۴]. همچنین مطالعات نشان می‌دهد فلاونوئیدها موجود در عصاره برگ گردو با افزایش آنتی‌اکسیدان پلاسما به عنوان داروهای قوی در برابر رادیکال-



### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مسئولین محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون که زمینه انجام این تحقیق را فراهم کردند، صمیمانه قدردانی می‌گردد.

### منابع

- 1- Antonijević N., M. Nesović, B. Trbojević, R. Milosević (1999), Anemia in hypothyroidism. *Medicinski Pregled*, 52(3-5): 136.
- 2- Areias F.M., P. Valentao, P.B. Andrade, F. Ferreres, R.M. Seabra (2001), Phenolic fing reprint of peppermint leave. *Food Chemistry*, 73(30):7-11.
- 3- Biondi B., E.A. Palmieri, G. Lombardi, S. Fazio (2002), Effect of subclinical thyroid dysfunction on the heart. *Annals of Internal Medicine*, 137(11): 904-914.
- 4- Carroen J.P., G.C. Limenez, J.I. Vega (2002), Genotoxic and antigenotoxic properties of calendula of ficinalis extract in rat liver cell cultures tread with diethyl initosamin. *Toxical in Vitro*, (16): 235-258.
- 5- Cesquini M., M.A. Torsoni, G.R. Stoppa, S.T. Ogo (2003), t-BOOH-induced oxidative damage in sickle red blood cells and the role of flavonoids. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 57(3): 124-129.
- 6- Chaudhuri S., A. Banerjee, K. Basu, B. Sengupta, P.K. Sengupta (2007), Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: antioxidant and antihemolytic effects. *International Journal of Biology of Macromolecules*, 41(1): 42-48.
- 7- Chauhan N., K.C. Wang, J. Wegiel, M.N. Malik (2004), Walnut extract inhibits the

تشکیل ترومبوکسان  $A_2$  مهار می‌شود در نتیجه منجر به مهار فسفوریلاسیون  $P_{47}$  و حرکت کلسیم داخل سلولی می‌شود و سرانجام به مهار تجمع پلاکت می‌انجامد [۳۴]. فلاونوئیدهای موجود در عصاره برگ گردو متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که می‌توانند مستقیماً تولید میانجی‌گرهای التهابی، همچنین تولید و فعالیت پیامبرهای ثانویه و بیان فاکتورهای رونویسی نفوذ کنند و کلید مولکول‌های پیش-التهابی هستند. بنابراین با توجه به اینکه عصاره متابولیت ثانویه محسوب می‌شود، می‌تواند در درمان بیماری‌ها با اختلالات اتوزینوفیلی موثر باشند [۶].

بررسی‌ها نشان می‌دهد ترکیبات موجود در عصاره برگ گردو تولید کموکین‌ها را در طی بکارگیری اتوزینوفیل‌ها در جایگاه‌های التهابی آلرژیک مهار می‌کنند [۲۶].

ترکیبات فلاونوئیدی و پلی‌فنول‌ها در برگ گردو و سایر گیاهان مهار کننده قوی فسفولیپاز  $A_2$  و تولیدات لکوترین‌ها  $B_4$  هستند که هر دو در مهاجرت اتوزینوفیل‌ها دخالت دارند [۸].

### نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج بدست آمده از این تحقیق احتمالاً عصاره آبی الکلی برگ گردو گلبول‌های قرمز و هموگلوبین را در برابر آسیب‌های اکسیدانی محافظت می‌کند. همچنین باعث کاهش تعداد اتوزینوفیل می‌گردد. از سوی دیگر فلاونوئیدهای موجود در عصاره نیز با تأثیر بر عملکرد پلاکت از چسبندگی و تجمع آنها جلوگیری و تعداد پلاکت را تا حد طبیعی در شرایط ابتلا به کم کاری تیروئید افزایش می‌دهد.





induced liver damage in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53(11):1569-74.

16- Grinberg L.N., E.A. Rachmilewitz, H. Newmark (1994), Protective effects of rutin against hemoglobin oxidation. *Biochemical Pharmacology*, 48(4), 643-649.

17- Jafarzadeh A., M. Poorgholami, N. Izadi, M. Nemati, M. Rezayati (2010), Immunological and hematological changes in patients with hyperthyroidism or hypothyroidism. *Clinical and Investigative Medicine*, 33(5): 271-279.

18- Javidanpour S., S.R. Fatemi Tabtabaei, A. Siahpoosh, H. Morovati, A. Shahriari (2012), Comparison of the effects of fresh leaf and peel extracts of walnut (*Juglans regia* L.) on blood glucose and  $\beta$ -cells of streptozotocin-induced diabetic rats. *In Veterinary Research Forum*, 3(4): 251-255.

19- Kazemi-Jahromi M., A. Shahriari-Ahmadi, S. Doostmohamadian, S.F. Allameh (2010), The Association Between Hypothyroidism and Anemia: a Clinical Study. *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research*, 4(3): 6-9.

20- Kitagawa S., H. Sakamoto, H. Tano (2004), Inhibitory effects of flavonoids on free radical-induced hemolysis and their oxidative effects on hemoglobin. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 52(8): 999-1001.

21- Koga T., M. Meydani (2001), Effect of plasma metabolites of (+)-catechin and quercetin on monocyte adhesion to human aortic endothelial cells. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(5): 941-948.

fibrillization of amyloid beta-protein, and also defibrillizes its preformed fibrils. *Current Alzheimer Research*, 1(3): 183-188.

8- Cinemre H., C. Bilir, F. Gokosmanoglu, T. Bahcebasi (2009), Hematologic Effects of Levothyroxine in Iron-Deficient Subclinical Hypothyroid Patients: A Randomized, Double-Blind, Controlled Study. *Original Articles in Endocrine Care*, 94(1):151-156.

9- Coban E., G. Yazicioglu, M. Ozdogan (2007), Platelet activation in subjects with subclinical hypothyroidism. *Medical Science Monitor*, 13(4): 211-214.

10- Cosmulescu S., I. Trandafir, G. Achim, M. Botu, A. Baci, M. Gruia (2010), Phenolics of green husk in mature walnut fruits. *Cluj Journal*, 38(1): 53-56.

11- Das C., P.K. Sahana, N. Sengupta, D. Giri, M. Roy (2012), Mukhopadhyay P. Etiology of anemia in primary hypothyroid subjects in a tertiary care center in Eastern India. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 16(2): 361-362.

12- Dweck A.C. (2009), The internal and external use of medicinal plants. *Clinics in Dermatology*, 27(2):148-158.

13- Franklyn J.A. (1994), The management of hyperthyroidism. *New England Journal of Medicine*, 330(24): 1731-1738

14- Gebicka L., E. Banasiak (2009), Flavonoids as reductants of ferryl hemoglobin. *Acta Biochemica Polonica*, 56(3): 509-513.

15- Germanò M.P., V. D'Angelo, R. Sanogo, A. Morabito, S. Pergolizzi, R. De Pasquale (2001), Hepatoprotective activity of *Trichilia roka* on carbon tetrachloride-



- 29- Pereira A.L., M. Cesquini, E. Tomizawa, M.A. Torsoni, S.H. Ogo (2003), The beneficial effect of three flavonols against oxidative damage. *Journal of Food Biochemistry*, 27(2): 141-152.
- 30- Pereira J.A., I. Oliveira, A. Sousa, P. Valentao, P.B. Andrade, I.C. Ferreira, L.M. Estevinho (2007), Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, 45(11): 2287-2295.
- 31- Rogerio A.P., A. Sá-Nunes, L.H. Faccioli (2010), The activity of medicinal plants and secondary metabolites on eosinophilic inflammation. *Pharmacological Research*, 62(4): 298-307.
- 32- Sá-Nunes A., A.P. Rogerio, A.I. Medeiros, V.E. Fabris, G.P. Andreu, D.G. Rivera, L.H. Faccioli (2006), Modulation of eosinophil generation and migration by *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *International Immunopharmacology*, 6(9): 1515-1523.
- 33- Sharafati-Chaleshtori R., F. Sharafati-Chaleshtori, M. Rafieian (2011), Biological characterization of Iranian walnut (*Juglans regia*) leaves. *Turkish Journal of Biology*, 35: 635-9.
- 34- Sterzl J., J. Cudlin, N. Stienervova, D. Johanovska, J. Milerova (1981), The immunoinhibitory and Immunostimulatory effects of Hydroxyanthra -and Hydroxynaphthaquinone Derivatives. *Folia Microbiology*, 26(4): 169-175.
- 35- Taha N.A., M.A. Al-Wadaan (2011), Utility and importance of walnut, *Juglans regia* Linn: A review. *African Journal of Microbiology Research*, 5(32): 5796-5805.
- 22- Kukongviriyapan V., N. Somparn, L. Senggunprai, A. Prawan, U. Kukongviriyapan, A. Jetsrisuparb (2008), Endothelial Dysfunction and Oxidant Status in Pediatric Patients with Hemoglobin E-beta Thalassemia, *Pediatr. Cardiology*, 29(1): 130-135.
- 23- Landolfi R., R.L. Mower, M. Steiner (1984), Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids: structure-activity relations. *Biochemical Pharmacology*, 33(9): 1525-1530.
- 24- Malgor L.A., C.C. Blanc, E. Klainer, S.E. Irizar, P.R. Torales, L. Barrios (1975), Direct effects of thyroid hormones on bone marrow erythroid cells of rats. *Blood*, 45(5): 671-679.
- 25- Masunaga R., A. Nagasaka, A. Nakai, M. Kotake, Y. Sawai, N. Oda, H. Hidaka (1997), Alteration of platelet aggregation in patients with thyroid disorders. *Metabolism*, 46(10): 1128-1131.
- 26- Middleton E., C. Kandaswami, T.C. Theoharides (2000), The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, 52(4): 673-751.
- 27- Narayana K.R., M.S. Reddy, M.R. Chaluvadi, D.R. Krishna (2001), Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*, 33(1): 2-16.
- 28- Oliveira I., A. Sousa, I.C. Ferreira, A. Bento, L. Estevinho, J.A. Pereira (2008), Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *Food and Chemical Toxicology*, 46(7): 2326-2331.



resistance to oxidative stress: in vitro and in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1523(1): 117-122.

39- Zhu Q.Y., R.R. Holt, S.A. Lazarus, T.J. Orozco, C.L. Keen (2002), Inhibitory effects of cocoa flavanols and procyanidin oligomers on free radical-induced erythrocyte hemolysis. *Experimental Biology and Medicine*, 227(5): 321-329.

40- Zimmermann B.M., J. Köhrle (2002), The Impact of Iron and Selenium Deficiencies on Iodine and Thyroid Metabolism: Biochemistry and Relevance to Public Health. *Thyroid*, 12(10): 867-878.

36- Wilms L.C., P.C. Hollman, A.W. Boots, J. Kleinjans (2005), Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 582(1-2): 155-162.

37- Yen P.M. (2001), Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiological Reviews*, 81(3): 1097-1142.

38- Youdim K.A., B. Shukitt-Hale, S. MacKinnon, W. Kalt, J.A. Joseph (2000), Polyphenolics enhance red blood cell

Archive of SID