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 زیست شناسی، کازرون، ایران
مسئول مکاتبات: Mokhtar_mokhtary@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۸

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 کم کاری تیروئید مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش از ٦٠ 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 تجربی۱، کم کاری تیروئید که داروی متی‌مازول بصورت گاواژ به مدت ۱۰ روز دریافت کرد. گروه تجربی ۲، تیمارشده با عصاره برگ گردو به میزان (mg/kg)۱۵۰۰، گروه تجربی ۳ و ٤ که علاوه بر القای هایپوتیروئیدیسم به ترتیب و روزانه (mg/kg)۱۵۰۰ و۷۵۰ عصاره برگ گردو را بصورت خوراکی و به مدت ٤ هفته دریافت کردند و شاخص‌های هماتولوژیک شامل گلبول‌های قرمزوسفید، نوتروفیل، لنفوسیت، مونوسیت، ائوزینوفیل، بازوفیل، پلاکت، هماتوکریت، هموگلوبین، MCH، MCHC وMCV اندازه‌گیری شد. نتایج با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس ANOVA و نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت ($P<۰/۰۵$). بر اساس نتایج آماری بدست آمده از این تحقیق در گروه تجربی ۱، تعداد گلبول قرمز، هموگلوبین، پلاکت، لنفوسیت، MCH، MCHC نسبت به گروه کنترل و شاهد کاهش و ائوزینوفیل افزایش معنی‌داری را نشان داده است. در گروه‌های تجربی ۳ و ٤ نسبت به گروه تجربی ۱، تعداد گلبول قرمز، هموگلوبین و پلاکت افزایش وائوزینوفیل کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد. براساس نتایج این تحقیق و مطالعات سایر محققان، احتمالاً عصاره آبی الکلی برگ گردو بعلت داشتن ترکیبات فلاونوئیدی و پلی فنلی که دارای خاصیت آنتی اکسیدانی 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

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_4) و تیروکسین (T_3) آزاد است، بوجود می-آید. میزان شیوع آن از ۱/۳٪ تا ۱۷/۵٪ است و وابسته به سن، جنس و میزان جذب ید می‌باشد (٤۰، 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

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. هم اکنون 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 بطور سنتی برای درمان برخی از بیماری‌ها نظیر معده درد، آسم، اگزما، بیماری‌های پوستی، سینوزیت، بیماری‌های آندوکرینی، بیماری‌های عفونی و انگلی مورد استفاده قرار می‌گیرد. ترکیبات موجود در آن دارای خواص ضدمیکروبی 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 ،آنتی اکسیدانی، ضدآلرژیکی، محافظت‌کننده کبدی، آنتی ترومبیک و ضدویروسی تشخیص داده شده است.

فلاونوئیدها یک نظم قابل توجه‌ای در فعالیت‌های بیوشیمیایی و فارماکولوژیکی نشان می‌دهند که 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 باشند [۲۲]. مطالعات Wills و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان می‌دهد، کوئرستین لنفوسیت‌هارا در برابر آسیب‌های ناشی از مواد شیمیایی محافظت می‌کند و می-تواند 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، ٤]. مطالعات Elliott Middleton و همکاران در سال ۲۰۰۰ نشان می‌دهد فلاونوئیدها قادرند آزادسازی هیستامین و سیتوکین‌ها از ماست‌سل‌ها را کاهش دهند و با تولید کمک‌کننده‌های T نوع ۲ (TH2) سیتوکین را از طریق فعال کردن بازوفیل‌ها مهار کنند [۳۱،۲٦، ۳۲].

با توجه به شیوع بیماری هایپوتیروئیدیسم در جوامع امروزی و اهمیت هورمون‌های تیروئید بر عملکرد سیستم-های 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 تا کنون 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 هایپوتیروئیدیسم مورد بررسی و مطالعه قرار نگرفته است، این تحقیق انجام شده است.

مواد و روش کار

در این مطالعه تجربی حیوانات مورد استفاده ٦٠ 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 ۲± ۲۳ 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 متی مازول 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 حیوانات۱۰ روز بعد از تجویز دارو از دم موش‌ها خون‌گیری به عمل آمد و غلظت هورمون‌های تیروئیدی تیروکسین (T_3) و تری یدوتیرونین (T_4) در سرم خون آنها توسط دستگاه ELISA Reader در بیمارستان قلب الزهرای 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 ۹٦٪ 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 دردستگاه سانتریفوژ با سرعت ٤٥٠٠ 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 ٤٠ 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 (۱۰±گرم) تعیین شود و در ادامه آنها به ٦ 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 هیچ گونه 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: ۱۰سر موش صحرایی نر و دریافت کننده فقط عصاره برگ گردو به میزان ۱۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه وبصورت گاواژ بود.

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

گروه تجربی ٤: ١٠ سر موش صحرایی نر که دریافت کننده ٢٥ میلی‌گرم بر کیلوگرم داروی متی‌مازول به مدت ١٠ روز وعصاره برگ گردو به میزان ١٥٠٠ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه به مدت ٢٨ روز بصورت گاواژ بود.

بعد از ٢٨ روز تحت تأثیر بیهوشی خفیف با اتر از قلب خون‌گیری به عمل آمد. قبل از خونگیری ٦٠ شیشه استریل مخصوص نگهداری خون حاوی ٠/٥ میلی‌لیتر ماده ضدانعقاد خون آماده شد. پس از خونگیری، نمونه‌های خونی بلافاصله و با احتیاط برروی دیواره داخلی شیشه‌های مذکور ریخته و به آرامی با ماده ضد انعقاد مخلوط گردید. سپس شیشه‌های مورد نظر را در جعبه‌ای مخصوص محتوی یخ قرارداده و جهت انجام مراحل آزمایش به آزمایشگاه منتقل شدند. از دستگاه Cell counter شرکت Minbray برای اندازه‌گیری شاخص‌های خونی استفاده شد. دقت دستگاه صد در صد می‌باشد و مدت زمانی که خون در دستگاه قرار داده می‌شود حداکثر ٢ دقیقه می‌باشد. شمارش گلبول‌های قرمز و سفید بوسیله دستگاه و افتراق گلبول‌های سفید به روش دستی و Diff انجام گرفت.

به منظور تحلیل داده‌ها در این تحقیق از نرم‌افزار SPSS استفاده شد، برای مقایسه گروه‌ها و برای تعیین اثر تیمار بر گروه‌ها از آزمون آماری ANOVA یک‌طرفه و به دنبال آن تست Tukey برای آزمون تفاوت بین گروه‌ها استفاده شد. با استفاده از نرم‌افزار Excel نمودارهای مربوطه ترسیم گردید و در کلیه یافته‌ها P<٠/٠٥ به عنوان مرز معنی‌دار بودن از لحاظ آماری در نظر گرفته شد. داده‌ها بصورت Mean±SEM ارائه شد.

نتایج

نتایج بدست آمده به دنبال تأثیر عصاره آبی- الکلی برگ گردو بین گروه‌های تجربی، کنترل و شاهد به همراه محاسبات آماری بصورت جداول ارائه شده است. تجزیه و تحلیل آماری نتایج نشان داد میزان MCHC، MCH و درصد لنفوسیت در گروه هایپوتیروئیدیسم نسبت به گروه های کنترل و شاهد در سطح P<٠/٠٥ کاهش معنی داری را نشان می‌دهد. میزان MCHC، MCH و درصد لنفوسیت-ها در گروه‌های تجربی ٢ (عصاره برگ گردو)، ٣ و ٤ (عصاره برگ گردو+ هایپوتیروئیدیسم) با مقادیر١٥٠٠ و ٧٥٠ میلی‌گرم بر کیلوگرم در پایان روز ٢٨ نسبت به گروه هایپوتیروئیدیسم، کنترل و شاهد اختلاف معنی‌داری را در سطح P<٠/٠٥ نشان ندادند (جداول ٢ و ٣).

اثر عصاره آبی الکلی برگ گردو بر میانگین هموگلوبین خون: نتایج بدست آمده از میانگین میزان هموگلوبین خون در گروه‌های کنترل، شاهد و گروه تجربی ٢ دریافت کننده فقط عصاره برگ گردو به ترتیب ١٣/٥٦±٠/١٤، ٠/١٣± ١٣/٩٣ و ١٣/٥٤±٠/٢٢ گرم در دسی‌لیتر و در گروه‌های هایپوتیروئیدیسم، تجربی ٣ و ٤ (عصاره برگ گردو+ هایپوتیروئیدیسم) با مقادیر ١٥٠٠ و ٧٥٠ میلی‌گرم بر کیلوگرم به ترتیب ١٢/٣٦±٠/٥٠ و ١٤/١١±٠/٢٠، ١٣/٧٤±٠/٢٧ گرم در دسی‌لیتر 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 معنی‌داری را نشان داد (P<٠/٠٥). در گروه-های تجربی ٣ و ٤ میزان هموگلوبین نسبت به گروه هایپوتیروئیدیسم بصورت معنی‌داری افزایش یافت (P<٠/٠٥) (جدول ٢).

اثر عصاره آبی الکلی برگ گردو بر تعداد گلبول‌های قرمز **خون:** میانگین تعداد گلبول‌های قرمز خون در گروه‌های کنترل، شاهد و هایپوتیروئیدیسم به ترتیب ٧/٤٦±٠/١٠، ٧/٦٠±٠/٠٩ و ٦/٨٨±٠/١٩ میلی‌گرم در دسی‌لیتر و در گروه‌های تجربی ٣ و ٤ (عصاره برگ گردو+

هایپوتیروئیدیسم) با مقادیر (mg/kg) ۱۵۰ و ۷۵۰ به ترتیب ۰/۱۱ ±۷/۷۰، ۰/۱۲±۷/٦۸ میلی‌گرم در دسی‌لیتر بود. اختلاف میانگین تعداد گلبول قرمز خون در گروه هایپوتیروئیدیسم نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد کاهش معنی‌دار (P<۰/۰۵) و در گروه‌های تجربی ۳ و ٤ در مقایسه با گروه هایپوتیروئیدیسم افزایش معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵) (جدول۲).

اثر عصاره آبی الکلی برگ گردو بر تعداد پلاکت خون: میانگین تعداد پلاکت خون در گروه‌های کنترل، شاهد و هایپوتیروئیدیسم به ترتیب ۲۵/۷٤± ٦۹٤/۳، ۱۹/٥٤± ۷۰٤/٥ و ۲۱/۲٥±٦۱٤/۲ و در گروه‌های تجربی ۳ و ٤ (عصاره برگ گردو + هایپوتیروئیدیسم) با مقادیر ۱۵۰۰و ۷۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به ترتیب ۳۱/۳۷±۷٦۷/٤ و ۱۱/۲۷±۷۰۳ /۲ بود. اختلاف میانگین تعداد پلاکت خون در گروه هایپوتیروئیدیسم نسبت به گروه کنترل و شاهد کاهش معنی دار (P<۰/۰۵) و در گروه‌های تجربی۳ و ٤ در مقایسه با گروه هایپوتیروئیدیسم افزایش معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵) (جدول۲).

اثر عصاره آبی الکلی برگ گردو بر تعداد ائوزینوفیل خون میانگین تعداد ائوزینوفیل خون در گروه‌های کنترل، شاهد و هایپوتیروئیدیسم به ترتیب ۰/۲۹±۱/۱۲، ۰/۳± ۱/۱۹ و ۰/۲۷±۱/۲۹ و میانگین تعداد ائوزینوفیل در گروه تجربی ۲ (عصاره برگ گردو)، ۳ و ٤ (عصاره برگ گردو + هایپوتیروئیدیسم) با مقادیر ۱۵۰۰ و ۷۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به ترتیب با میانگین‌های ۰/۱۲± ۰/۱۲، ۰/۱۲± ۰/۲۱، ۰/۰۵± ۰/۱۵بود. اختلاف میانگین تعداد ائوزینوفیل خون درگروه هایپوتیروئیدیسم نسبت به گروه کنترل و شاهد در سطح P ≤۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری را نشان نداده است. میانگین تعداد ائوزینوفیل در گروه تجربی۲، ۳ و ٤ در مقایسه با گروه هایپوتیروئیدیسم و همچنین کنترل و شاهد کاهش معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵) (جدول ۳).

اختلاف معنی‌داری در تعداد کل گلبول‌های سفید خون، درصد لنفوسیت‌ها، مونوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها، بازوفیل‌ها، هماتوکریت، MCHC، MCH، MCV بین گروه‌های تجربی ۳ و ٤ نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد مشاهده نشد.

جدول ۱ـ مقایسه میانگین غلظت سرمی هورمون تری یدوتیرونین(T4)و تیروکسین(T3) بین گروه‌های هایپوتیروئیدیسم، کنترل و شاهد

گروه ها ی آزمایش	میزان هورمون T4 (µg/dl) (Mean±SEM)	میزان هورمون T_3 (ng/ml)
کنترل	۳/ ٦ ± ۰/۱۷	۱/ ۲ ± ۰/۱۵
شاهد	۳/ ٥± ۰/۰۲	۱/ ۳± ۰/۱۲
هایپوتیروئیدیسم (متی مازول)	۰ /۲± ۰/۰ ٤*	۰/٦± ۰/۰ ۲*

علامت ستاره (*) در جدول نشان دهنده‌ی تفاوت معنی دار بین گروه‌های هایپوتیروئیدیسم، کنترل و شاهد می‌باشد. مقادیر بر اساس میانگین ± خطای معیار میانگین (Mean ± SEM) ارائه شده است.

جدول۲ـ مقایسه میانگین شاخص‌های خونی بین گروه‌های تجربی، کنترل و شاهد در پایان دوره آزمایش

گروه‌های آزمایش	گلبول قرمز خون (mm^3)	هموگلوبین (gr×dl)	هماتوکریت (L/L)	MCHC (gr×dl)	MCV (FL)	MCH(pg)
کنترل	۷/٤٦± ۰/۱۰	۱۳/٥٦±۰/۱٤	۳۸/۷۸± ۰/٦۱	۳٥/٤۲ ±۰/۱٥	٥۲/۱ ±۰/٤۱	۱۸/۳۷ ±۰/۱۷
شاهد	۷/٦۰± ۰/۰۹	۱۳/۹۳ ± ۰/۱۳	۳۹/۰۲± ۰/۷۳	۳٥/٦٤± ۰/۱۹	٥۱/۳± ۰/۲٦	۱۸/۲٥± ۰/۱۳
تجربی۱(هایپوتیروئیدیسم)	٦/۸۸± ۰/۱۹*	۱۲/۳٦±۰/٥۰*	۳۷/٦۳± ۱/۰٦	۳٤/۸۳±۰/۲۷*	٥۲/٤۹±۰/٦۷	۱۷/٦۳±۰/۱۷*
تجربی ۲(عصاره برگ گردو به مقدار ۱٥۰۰mg/kg)	۷/٤۹۳± ۰/۱۳	۱۳/٥٤±۰/۲۲	۳۸/٤۸± ۰/۷۳	۳٥/۱٥±۰/۱۳	٥۱/۳۸±۰/٦۷	۱۸/۰۲±۰/۲۱
تجربی ۳ (هایپوتیروئیدیسم + عصاره برگ گردو به مقدار ۷٥۰ mg/kg)	۷/۷۰± ۰/۱۱**	۱٤ /۱۱±۰/۲۰**	۳۹/۸۳± ۰/٤٤	۳٥/۳۷±۰/۱۸	٥۱/۷±۰/۳٦	۱۸/۲٤±۰/۱۰
تجربی٤ (هایپوتیروئیدیسم+ عصاره برگ گردو به مقدار۱٥۰۰ mg/kg)	۷/٦۸± ۰/۱۲**	۱۳ /۷٤±۰/۲۷**	۳۸/۷٦± ۰/۷۰	۳٥/۳۸±۰/۱۰	٥۰/٥۲±۰/٤٥	۱۷/۸٤±۰/۱۹

علامت ستاره (*) در جدول نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار بین گروه تجربی ۱ با کنترل و شاهد می‌باشد و علامت (**) نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های تجربی ۳ و تجربی ٤ باگروه تجربی ۱ می باشد. مقادیر بر اساس میانگین ± خطای معیار میانگین (Mean ± SEM) آورده شده است.

جدول ۳ـ 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	٦۹٤/۳ ±۲٥/۷٤	٦/۲± ۰/٤٤	۳٦/۲±۱/۸۷	۲/۳ ±۰/۲٦	٦۰/۰۷ ±۱/٥۸	۱/۱۲±۰/۲۹	۰ ± ۰
شاهد	۷۰٤/ ٥±۱۹/٥٤	**٦/۷± ۰/۷٦**	**۳۷/۳± ۲/۸۹**	**۲/۳± ۰/۲۳**	**٦۱/۳± ۱/۷۲**	**۱/۱۹ ±۰/۳**	۰ ± ۰
تجربی۱ (هایپوتیروئیدیسم)	٦۱٤/۲±۲۱/۲٥*	**۷/٥± ۰/۷٦**	**۳۷/۱±٦/۰٥**	**۲/٤±۰/۲٦**	**٥۳/۲±۳/٥۲***	**۱/۲۹±۰/۲۷**	۰ ± ۰
تجربی ۲ (عصاره برگ گردو به مقدار ۱٥۰۰ mg/kg)	۷۱٤±۲۱/۷٥	**۷/۹± ۰/۹۱**	**۳۳/٥±۲/۷۱**	**۲/۳±۰/۳**	**٦۱/۱±۳/۰۷**	**۰/۱۲±۰/۱۲***	۰/۱±۰/۱
تجربی۳ (هایپوتیروئیدیسم + عصاره برگ گردو به مقدار ۷٥۰mg/kg)	۷٦۷/٤±۳۱/ ۳۷**	**٦ ± ۱/۰۲**	**٤۰/٦±٤/۲۹**	**۲/٥±۰/۲**	**٥۷/۸±٤/٦۳**	**۰/۲۱±۰/۱۲****	۰ ± ۰
تجربی٤ (هایپوتیروئیدیسم+ عصاره برگ گردو به مقدار ۱٥۰۰mg/kg)	۷۰۳/۲±۱۱/ ۲۷**	**۷/۷± ۰/۷۸**	**۳٤/۷±۳/۷۳**	**۲/٦±۰/۲۲**	**٥۹/٦±٤/٥۰**	**۰./۱٥±۰/۰٥****	۰ ± ۰

علامت ستاره (*) در جدول نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار بین گروه تجربی ۱با کنترل و شاهد می‌باشد و علامت (**) نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های تجربی ۳ و تجربی ٤ با گروه تجربی ۱ می‌باشد. مقادیر بر اساس میانگین ± خطای معیار میانگین (Mean ± SEM) آورده شده‌اند.

بحث

ارتباط بین هایپوتیروئیدیسم و کم خونی در بیماران مبتلا به آن مکرراگزارش شده است [۲٤]. مطالعه حاضر نشان می-دهد، 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 ازطریق تأثیر بر فرایند هماتوپوئیتیک در سنتز هموگلوبین دخالت دارند. در افراد هایپوتیروئیدیسم کمبود هورمون‌های تیروئیدی باعث ایجاد کم خونی می‌شود و فرایند متابولیسم اکسیژن کند می‌شود [۱۹]. برگ گردو حاوی آنتی‌اکسیدان-هایی نظیر فلاونوئیدها می‌باشد که گروهی از ترکیبات پلی فنلی هستند [۲۷، ۱۸]. آهن در ساختمان هموگلوبین مسئول انتقال اکسیژن به بافت‌ها است [۱٤]. در بررسی‌ها اثر سودمند فلاونوئیدها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو بر هموگلوبین و سلول‌های قرمز خون که ناشی از هیدرو پراکسیدات‌هاست مطالعه شده است [۲۹، ٥]. یافته‌ها نشان می‌دهد فلاونوئیدهای آبگریز 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 [۱٤، ۱٦]. همچنین مطالعات نشان می‌دهد فلاونوئیدها موجود در عصاره برگ گردو با افزایش آنتی اکسیدان پلاسما به عنوان داروهای قوی در برابر رادیکال-های آزاد در محیط هستند که رادیکال‌های آزاد به غشا گلبول‌های قرمز حمله می‌کنند و باعث پراکسیداسیون لیپیدی و همولیز گلبول قرمز می‌شوند [٦، ۳۹]. با توجه به اتصال فلاونوئیدها به غشای گلبول‌های قرمز خون آنها می-توانند بطور قابل توجهی پراکسیداسیون لیپیدی را مهار و از همولیز گلبول قرمز جلوگیری کنند [٦]. مطالعات نشان می-دهد تجمع پلاکت از طریق آدنوزین دی‌فسفات در خون بیماران مبتلا به هایپوتیروئیدیسم تحریک می‌شود [۲٥]. 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 آتروترومبوتیک در افراد مبتلا به کم‌کاری تیروئید می‌گردد. سایر تحقیقات نشان می‌دهد چندین نوع فلاونوئید در عصاره برگ گردو بطور معنی‌دار بر چسبندگی، تجمع و ترشح پلاکت‌ها تأثیر دارد [۹، ۲٦]. برخی فلاونوئیدها شامل فلاون، کریسن، فلوریتین از تجمع پلاکت‌ها از طریق مهار مسیر سیکلواکسیژناز جلوگیری می-کنند. علاوه بر این فلاون، کرسین و آپی‌ژنین موجود در عصاره، سیکلیک آدنوزین مونوفسفات (cAMP) پلاکت را در پاسخ به پروستاسیکلین ۲ (PGI_2) 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 پروستاسیکلین ۲ (PGI2) 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

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 [۳٤]. فلاونوئیدهای موجود در عصاره برگ گردو متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که می‌توانند مستقیماً تولید میانجی‌گرهای التهابی، همچنین تولید و فعالیت پیامبرهای ثانویه وبیان فاکتورهای رونویسی نفوذ کنند و کلید مولکول‌های پیش‌التهابی هستند. بنابراین با توجه به اینکه عصاره متابولیت ثانویه محسوب می‌شود، می‌توانند در درمان بیماری‌ها با اختلالات ائوزینوفیلی موثر باشند [٦].

بررسی‌ها نشان می‌دهد ترکیبات موجود در عصاره برگ گردو تولید کموکین‌ها را در طی بکارگیری ائوزینوفیل‌ها در جایگاه‌های التهابی آلرژیک مهار می‌کنند [۲٦].

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 ائوزینوفیل‌ها 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 ائوزینوفیل 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.

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 ofsubclinical 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 initrosamin. *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

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. *Orginal 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. Baciu, 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 primery 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-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 β-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.

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.

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. Stienerovoa, D. Johanovska, J. Milerova (1981), The immunoinhibitory and Immunostimulatory effects of Hydroxyanthera –and Hydroxynaphtaquinone 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.

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 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.