

## اثر مهاری عصاره هیدروالکلی پوست گردو بر کاهش اکسیداسیون لیپوپروتئین با چگالی کم در محیط آزمایشگاهی

نویسندگان:

حسن احمدوند<sup>۱\*</sup>، علی خسروبیگی<sup>۲</sup>، غلامرضا شهسوار<sup>۲</sup>، فواد عبدالله پور<sup>۲</sup>، شاهرخ باقری<sup>۲</sup>، مرضیه رشیدی پور<sup>۳</sup>

- ۱- مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران
- ۲- بخش بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران
- ۳- بخش شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خرم آباد، خرم آباد، ایران
- ۴- باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خرم آباد، خرم آباد، ایران

فصلنامه دانشگاه علوم پزشکی جهرم، دوره نهم، شماره سه، پاییز ۱۳۹۰

### چکیده:

**مقدمه:** اکسیداسیون لیپیدها و از جمله لیپوپروتئین با چگالی کم (LDL) نقش مهمی در ایجاد آترواسکلروز دارد. با استفاده از مواد آنتی-اکسیدان از قبیل ویتامین E و عصاره هیدروالکلی پوست گردو در جیره غذایی می‌توان از اکسیداسیون LDL جلوگیری کرد و بدین ترتیب مانع ایجاد و پیشرفت آترواسکلروز شد. در مطالعه حاضر، اثرات عصاره هیدروالکلی پوست گردو بر اکسیداسیون LDL سرم ناشی از سولفات مس در محیط آزمایشگاهی بررسی می‌شود.

**روش کار:** از افراد سالم بعد از یک شب ناشتایی نمونه خون گرفته شد. سپس LDL سرم جدا شده گروه‌های کنترل، اکسید شده با مس و عصاره هیدروالکلی پوست گردو با غلظت‌های ۰/۲، ۲ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مطالعه شدند. برای بررسی اکسیداسیون LDL، مقدار دی‌ان‌های کونجوگه، زمان تاخیری (Lag time) و مالون‌دی‌آلدئید (MDA) حاصل اندازه‌گیری و اثرات غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی پوست گردو بر مهار اکسیداسیون LDL سرم در حضور مس بررسی شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان می‌دهد عصاره هیدروالکلی پوست گردو باعث کاهش اکسیداسیون LDL سرم می‌شود، به طوری که زمان تاخیری در غلظت‌های عصاره ۰/۲، ۲ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۸۷، ۱۷۸ و ۲۰۲ درصد می‌باشد. به عبارت دیگر، اثر مهاری عصاره هیدروالکلی پوست گردو بر اکسیداسیون LDL با غلظت عصاره متناسب است.

**بحث و نتیجه‌گیری:** نتایج نشان می‌دهد عصاره هیدروالکلی پوست گردو از اکسیداسیون LDL جلوگیری می‌کند. چنین ترکیبی ممکن است اثرات مشابهی نیز در موجودات زنده داشته باشد.

### واژگان کلیدی: گردو، LDL، محیط آزمایشگاهی

#### مقدمه:

از قبیل ویتامین E و مواد گیاهی مانند پوست گردو که غنی از مواد آنتی‌اکسیدان است، می‌توان از اکسیداسیون LDL جلوگیری و در نتیجه مانع ایجاد آترواسکلروز شد [۲]. پاتوژنز آترواسکلروز پیچیده است، ولی شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد اکسیداسیون لیپیدها و LDL یکی از وقایع مهمی است که در تشکیل پلاک‌های

اکسیداسیون LDL نقش مهمی در ایجاد آترواسکلروز دارد. به کارگیری اکسیدان‌ها در مواد غذایی، LDL اکسید شده تولید می‌کند که باعث ایجاد و پیشرفت آترواسکلروز می‌شود [۱]. وقتی LDL اکسید می‌شود، تمایل آن به رسپتورس کاهش می‌یابد. تجمع LDL اکسید شده در ماکروفاژها منجر به پیدایش سلول‌های کف-آلود و تشکیل آترواسکلروز می‌شود. با استفاده از مواد آنتی‌اکسیدان

\* نویسنده مسئول، آدرس: خرم آباد، کیلومتر ۵ جاده خرم آباد بروجرد، پردیس دانشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی

تلفن تماس: ۰۹۱۳۲۲۶۷۸۹۳، ۰۶۶۶۱۶۲۰۰۱۳۳، دورنگار: ۰۶۶۱۶۲۰۰۱۳۳، پست الکترونیک: hassan\_a46@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۲/۰۷

تاریخ اصلاح: ۱۳۹۰/۰۲/۰۶

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۰۳/۲۳

**تهیه عصاره هیدروالکلی پوست گردو:** عصاره هیدروالکلی پوست گردو از مرکز تحقیقات داروهای گیاهی دانشگاه علوم پزشکی لرستان تهیه شد. برای تهیه عصاره هیدروالکلی پوست گردو، ابتدا پوست سبز گردو در سایه خشک و سپس پودر شد. صد گرم از این پودر در الکل ۵۰ درصد به مدت نه ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد در دستگاه سوکسله قرار داده شد و عصاره به دست آمده بعد از عبور از صافی، خشک و ماده مومی حاصل در دمای چهار درجه سانتی گراد نگهداری شد (۲,۲۸۷ درصد).

**نمونه گیری خون:** ابتدا نمونه‌های خون از افراد سالم گرفته شد. سرم نمونه‌های خون با استفاده از سانتریفوژ (به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه) جدا شدند و برای جلوگیری از اکسیداسیون به آن‌ها سدیم آزید با غلظت نهایی 0.06% wt/vol اضافه شد.

**جداسازی LDL:** LDL سرم‌ها در مرکز تحقیقات قلب و عروق دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به روش ناپیوسته شیب غلظتی با استفاده از اولتراسانتریفوژ جدا شدند. چگالی سرم با افزودن برمید پتاسیم (0.365 g/ml) به ۱/۲۱ گرم در میلی لیتر رسانده شد. به لوله‌های سانتریفوژ ۳/۵ میلی لیتر سدیم کلرید (0.154 mol/lit) و ۱/۵ میلی لیتر از سرم‌های غلیظ شده اضافه شد و در اولتراسانتریفوژ بکمن L7-55 با سرعت ۴۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت دو و نیم ساعت در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد سانتریفوژ و سپس لایه زرد رنگ LDL جدا شد. LDL جدا شده به مدت ۴۸ ساعت در دمای چهار درجه سانتی گراد در بافر فسفات نرمال سالین (0.01 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.16 mol/L NaCl, pH 7.4) اکسیژن زدایی شده و در محلول حاوی سدیم آزید 0.01% و EDTA Ethylene Diamine Tetra Acetic acid (EDTA) 0.01% دیالیز شد. بافر در زمان دیالیز سه مرتبه تعویض شد [۱۵].

**اکسیداسیون LDL:** بعد از جداسازی LDL، غلظت پروتئین آن با استفاده از روش برادفورد اندازه‌گیری شد [۱۶]. برای بررسی اکسیداسیون LDL با PBS ۱۰ میلی مولار و pH= ۷/۴ به ۱۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر رسید. به دنبال آن، کنترل که حاوی LDL و نمونه حاوی سولفات مس ۱۰ میکرومولار فاقد عصاره و نمونه‌های حاوی سولفات مس ۱۰ میکرومولار و عصاره هیدروالکلی پوست گردو با غلظت‌های ۰/۲، ۲ و ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود تهیه شد و معادل حجم عصاره‌های استفاده شده، حلال به نمونه کنترل و مس اضافه شد. با اندازه‌گیری میزان جذب اشعه ماوراء بنفش محلول در طول موج ۲۳۴ نانومتر هر ده دقیقه یک مرتبه تغییرات اکسیداسیون LDL برای مدت زمان پنج ساعت تعیین شد [۱۷]. به منظور ارزیابی کینتیک اکسیداسیون LDL منحنی جذب،

آترواسکلروز نقش دارند [۳ و ۴]. از سوی دیگر، عوامل اکسیداتیو و عوامل التهاب زا به شکل چرخه معیوب در ایجاد و توسعه آترواسکلروز، به عنوان یک بیماری التهابی نقش دارند [۵-۷]. گیاه مورد استفاده در این پژوهش، «گردو» است که با نام علمی *Juglans regia* شناخته می‌شود. گردو از گیاهان بومی کشور ایران می‌باشد. پوست گردو غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان از جمله ترکیبات فنلی است [۸ و ۹]. مهم‌ترین ترکیبات فنلی پوست گردو نفتوکینون و فلاونوئیدها می‌باشند. جوگلون (۵- هیدروکسی ۱-۴- نفتوکینون) یک ترکیب شناخته شده است که در برگ‌های تازه و در پوست گردو وجود دارد، ولی به خاطر پلیمریزاسیون، مقدار آن در پوست و برگ خشک گردو اندک است [۱۰]. ترکیبات دیگری از جمله کلروژنیک اسید، کافئیک اسید، فرولیک اسید، سیناپیک اسید، گالیک اسید، میرستین، هیدروکسیسینامیک اسیدها، کوئرستین، کاتچین و ترکیبات فنلی دیگر در پوست سبز گردو وجود دارند [۱۱ و ۱۲]. برگ گردو برای درمان دردهای روماتیسمی، تب، دیابت، بیماری‌های پوستی، ریشه آن برای درمان دیابت و گل آن برای درمان مالاریا استفاده می‌شود [۱۳]. به علاوه، برگ گردو در طب سنتی نیز دارای مصارف متعدد از جمله درمان سردرد، سرمازدگی و بیماری‌های پوستی است. برگ گردو باعث کاهش ریسک ابتلا به بیماری‌های قلبی می‌شود و در درمان هموروئید، اسهال، بیماری‌های قارچی، افت فشار خون و کاهش قند خون استفاده می‌شود [۱۰ و ۱۴]. مطالعات اندکی در مورد پوست گردو وجود دارد و هیچ مطالعه‌ای در راستای بررسی تاثیر آن بر کاهش اکسیداسیون سرم در محیط آزمایشگاهی انجام نشده است.

با توجه به شواهد نظری، استرس اکسیداتیو مهم ترین عامل در ایجاد آترواسکلروز است. بنابراین از هر ماده‌ای که در مهار استرس اکسیداتیو موثر است می‌توان برای جلوگیری از آترواسکلروز استفاده کرد. به نظر می‌رسد درمان با این عصاره یا سایر آنتی اکسیدان‌ها بتواند در مهار استرس اکسیداتیو و سایر سازوکارهای آسیب‌زا موثر واقع شود. هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی خواص آنتی اکسیدانی عصاره هیدروالکلی پوست گردو در اکسیداسیون LDL ناشی از سولفات مس می‌باشد.

## روش کار:

**مواد:** دی‌سدیم اتیلن‌دی‌آمین تترااستات (Na<sub>2</sub>EDTA)، پتاسیم- برمید، سدیم کلرید، دی‌سدیم هیدروژن فسفات (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) از شرکت سیگما خریداری شدند.

آماري و اختلاف بين گروه‌ها با کمک نرم افزار SPSS و با استفاده از آزمون من‌ويتنی تحليل شد.

### يافته‌ها:

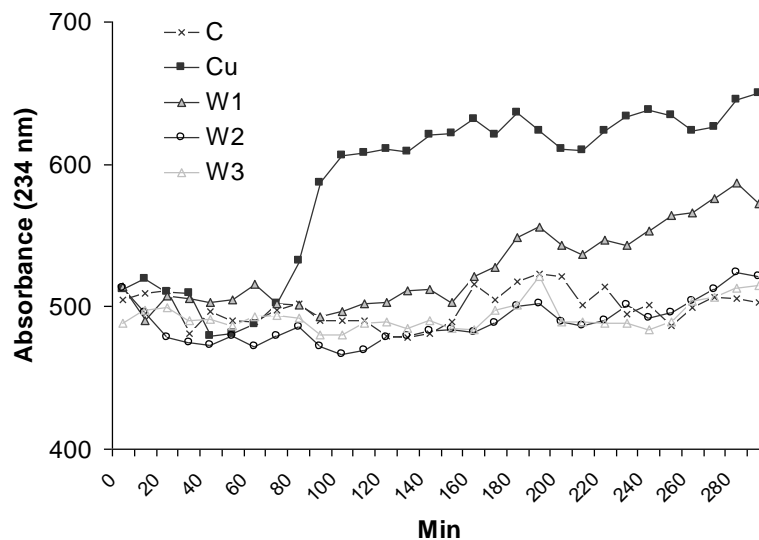
بعد از اضافه کردن مس و غلظت‌های مورد نظر عصاره هیدروالکلی پوست گردو به نمونه‌ها و قرائت میزان جذب نمونه‌ها به طور مستمر هر ده دقیقه یک مرتبه، منحنی کینتیک اکسیداسیون LDL رسم شد و مقدار دی‌ان‌های کونجوگه MDA تشکیل شده اندازه‌گیری شد. نتایج بررسی نشان داد که عصاره هیدروالکلی پوست گردو به طور معناداری اکسیداسیون LDL در محیط آزمایشگاهی را کاهش می‌دهد ( $P < 0.05$ ). اثر عصاره هیدروالکلی پوست گردو بر مهار اکسیداسیون LDL با غلظت عصاره هیدروالکلی پوست گردو به طور خطی متناسب است. به منظور بررسی کینتیک اکسیداسیون LDL، میزان جذب ها در طول موج ۲۳۴ نانومتر بر حسب زمان رسم شد (نمودار ۱). در این نمودار سه قسمت مجزا دیده می‌شود که عبارتند از فاز تأخیری (Lag phase)، فاز انتشار توسعه (propagation phase) که با افزایش شدت اکسیداسیون LDL همراه است و فاز تجزیه خاتمه (decomposition phase) که پایان اکسیداسیون LDL می‌باشد.

میزان جذب نمونه‌ها بر حسب زمان رسم شد و با استفاده از منحنی رسم شده زمان تاخیری و غلظت پایانی دی‌ان‌های کونجوگه بعد از پنج ساعت با استفاده از ضریب خاموشی مولی  $29500 \text{ Lit} / \text{mol} / \text{cm}$  تعیین شد.

### اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید (Malondialdehyde - MDA)

**تشکیل شده:** بر اساس روش Burge و Aust محصول پایانی پراکسیداسیون لیپید، MDA، اندازه‌گیری شد. برای این کار، بعد از اضافه کردن املاح سولفات مس و عصاره به نمونه‌های LDL، برای مدت پنج ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد اینکوبه شدند و در پایان با اضافه کردن EDTA با غلظت پایانی ۲ میلی مولار واکنش اکسیداسیون متوقف شد. برای اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپید ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه، ۱/۵ میلی لیتر تیوباربیتوریک اسید ۰/۶ درصد، و یک میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به نمونه‌ها اضافه شد و برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای جوش قرار داده شدند. بعد از سرد شدن، محلول به مدت ۱۵ دقیقه در سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و میزان جذب محلول‌های رویی در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقادیر به دست آمده با استفاده از ضریب خاموشی مولی برابر با  $1.05 \times 10^5 \text{ Lit} / \text{mol} / \text{cm}$  به عنوان MDA تشکیل شده بر حسب  $\text{nm} / \text{mg} - \text{LDL}$  protein گزارش شد [۱۸ و ۱۹].

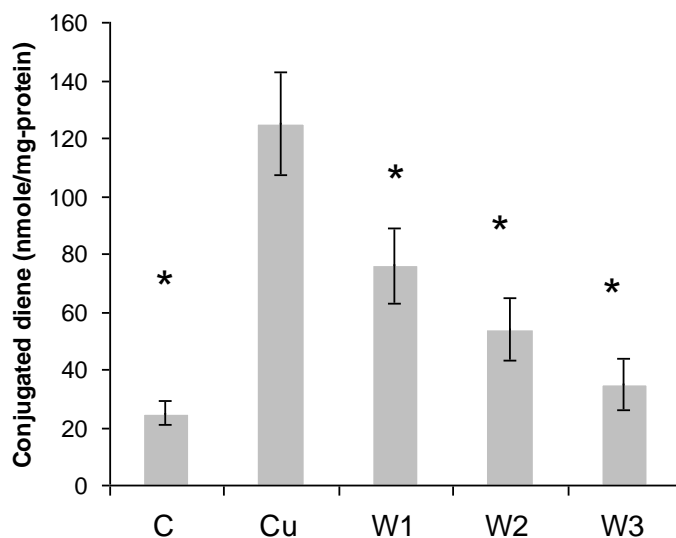
**تحلیل آماری:** نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده‌اند. معنادار بودن نتایج از نظر



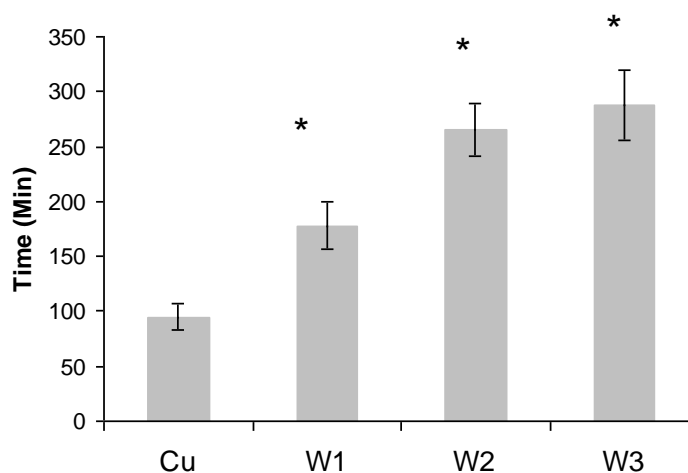
نمودار ۱: کینتیک اثر عصاره هیدروالکلی پوست گردو بر مهار اکسیداسیون LDL در محلول PBS ۱۰ میلی مولار،  $\text{pH} = 7.4$  در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۵ ساعت. هر نقطه میانگین سه آزمایش می‌باشد. n-LDL(C); Copper + n-LDL (Cu); n-LDL (W1); عصاره هیدروالکلی پوست گردو با غلظت  $(20 \mu\text{g/ml})$ ; n-LDL (W2); عصاره هیدروالکلی پوست گردو با غلظت  $(2 \mu\text{g/ml})$ ; n-LDL (W3); عصاره هیدروالکلی پوست گردو با غلظت  $(20 \mu\text{g/ml})$

۲. بر اساس نتایج اندازه‌گیری، اثر عصاره هیدروالکلی پوست گردو معنادار است. همچنین با استفاده از منحنی کینتیک، زمان تاخیری تعیین شد (نمودار ۳).

تغییرات اکسیداتیو LDL با اندازه‌گیری میزان جذب اشعه ماوراء بنفش محلول در طول موج ۲۳۳ نانومتر بعد از پنج ساعت تعیین شد که بر اساس آن، غلظت پایانی دی‌ان‌های کونجوگه با استفاده از ضریب خاموشی مولی 29500 Lit/mol/cm به دست آمد (نمودار



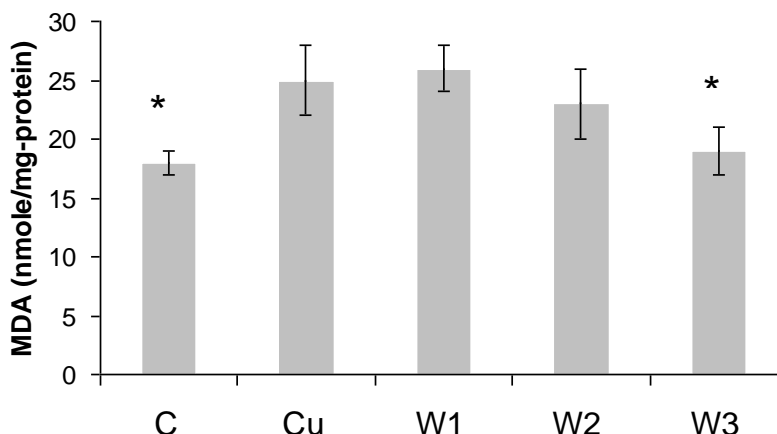
نمودار ۲: مقایسه اثر عصاره هیدروالکلی پوست گردو بر مهار تشکیل دی‌ان کونجوگه ناشی از اکسیداسیون LDL. هر نقطه میانگین سه آزمایش می باشد. علامت \* نشان دهنده آن است که نسبت به مس معنادار است ( $P < 0.05$ ). علامت های اختصاری مشابه نمودار ۱ است.



نمودار ۳: اثر عصاره هیدروالکل پوست گردو بر زمان تاخیری. هر نقطه سه آزمایش می باشد. علامت \* نشان دهنده آن است که نسبت به مس معنادار است ( $P < 0.05$ ). علامت‌های اختصاری مشابه نمودار ۱ و ۲ است.

برای بررسی MDA تشکیل شده، مطابق با روش توضیح داده شده میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر با استفاده از ضریب مولی به عنوان MDA تشکیل شده بر حسب nm/mg - LDL-protein اندازه‌گیری شد. بر اساس نتایج، اثر غلظت‌های مختلف عصاره

هیدروالکلی پوست گردو در کاهش MDA تشکیل شده نسبت به نمونه حاوی سولفات مس فاقد عصاره هیدروالکلی پوست گردو معنادار است (نمودار ۴).



نمودار ۴: مقایسه اثر عصاره هیدروالکلی پوست گردو بر مهار تشکیل MDA ناشی از اکسیداسیون LDL. هر نقطه میانگین سه آزمایش می باشد. علامت \* نشان دهنده آن است که نسبت به مس معنی‌دار است ( $P < 0.05$ ). علامت‌های اختصاری مشابه نمودار ۱ و ۲ است.

### بحث و نتیجه‌گیری:

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، عصاره هیدروالکلی پوست گردو به طور موثری باعث مهار اکسیداسیون LDL می‌شود. اکسیداسیون LDL در دیواره عروق عامل اصلی پیدایش و توسعه آترواسکلروز می‌باشد [۲]. بر اساس مطالعات انجام شده، مقدار مواد آنتی‌اکسیدان در افراد مبتلا به آترواسکلروز نسبت به افراد سالم کم‌تر است [۳]. مس از طریق واکنش فنتون و هاپرویس باعث ایجاد رادیکال‌های آزاد [۲۰ و ۲۱] و احتمالاً اکسیدشدن LDL می‌شود که به دنبال آن میزان لیپید پراکسیدها و دی‌ان‌های کونجوگه افزایش و میزان آنتی‌اکسیدان‌های موجود در ساختمان LDL از قبیل ویتامین E به دلیل تعامل با رادیکال‌های آزاد به وجود آمده توسط مس کاهش می‌یابد [۲]. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره هیدروالکلی پوست گردو به طور معناداری باعث کاهش دی‌ان‌های کونجوگه و MDA می‌شود. همچنین زمان تاخیری به خاطر اثر عصاره هیدروالکلی پوست گردو افزایش می‌یابد. با توجه به این که عصاره هیدروالکلی پوست گردو یک آنتی‌اکسیدان قوی

است و هر چند تا کنون تحقیقات کمی در مورد آن انجام شده است ولی مطالعاتی دال بر وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدان و اثرات ضدباکتریایی آن و همچنین استفاده از آن در درمان سرطان گزارش شده است [۱۳ و ۲۲]. با اندازه‌گیری شاخص‌های آنتی-اکسیدان از جمله قدرت احیاکنندگی، قدرت حذف رادیکال‌های آزاد و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی پوست پنج گونه گردو در کشور پرتقال مشخص شده است که نقش آنتی‌اکسیدانی پوست گردو قابل قیاس و در مواردی بهتر از آنتی‌اکسیدان‌هایی از قبیل ویتامین E و بتاکاروتن و BHA (hydroxyanisole Butylated) با غلظت‌های مشابه است [۲۲-۲۶].

**نتیجه‌گیری:** نتایج مطالعه حاضر نشان داد عصاره هیدروالکلی پوست گردو به طور موثری باعث مهار اکسیداسیون LDL می‌شود.

## References:

- Willcox BJ, Curb JD, Rodriguez BL. Antioxidants in cardiovascular health and disease: key lessons from epidemiologic studies. *Am J Cardiol* 2008; 101(10A): 75D-86D.
- Lobbess MB, Lutgens E, Heeneman S, et al. Is there more than C-reactive protein and fibrinogen? The prognostic value of soluble CD40 ligand, interleukin-6 and oxidized low-density lipoprotein with respect to coronary and cerebral vascular disease. *Atherosclerosis* 2006; 187(1): 18-25.
- Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 1997; 272(34): 20963-6.
- Ani M, Moshtaghi AA, Ahmadvand H. Comparative Effects of Copper, Iron, Vanadium and Titanium on Low Density Lipoprotein Oxidation in vitro. *Iran Biomed J* 2007; 11(2): 113-18.
- Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 1991; 88(6): 1785-92.
- Leopold JA, Loscalzo J. Oxidative risk for atherothrombotic cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med*. 2009; 47(12): 1673-706.
- Yekini I, Hammoudi F, Martin-Nizard F, Yous S, et al. Antioxidant activity of benzoxazolinonic and benzothiazolinonic derivatives in the LDL oxidation model. *Bioorg Med Chem* 2009; 17(22): 7823-30.
- Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, et al. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food and Chem Toxicol* 2007; 45(11): 2287-95.
- McKay DL, Chen CY, Yeum KJ, et al. Chronic and acute effects of walnuts on antioxidant capacity and nutritional status in humans: a randomized, cross-over pilot study. *Nutr J* 2010; 9: 21.
- Asgary S, Parkhideh S, Solhpour A, et al. Effect of ethanolic extract of *Juglans regia* L. on blood sugar in diabetes-induced rats. *J Med Food* 2008; 11(3): 533-8.
- Stampar F, Solar A, Hudina M, et al. Traditional walnut liqueur – cocktail of phenolics. *Food Chem* 2006; 95(4): 627-31.
- Liu J, Meng M, Li C, et al. Simultaneous determination of three diarylheptanoids and an  $\alpha$ -tetralone derivative in the green walnut husks (*Juglans regia* L.) by high-performance liquid chromatography with photodiode array detector. *J Chromatogr* 2008; 1190(1-2): 80-5.
- Carvalho M, Ferreira PJ, Mendes VS, et al. Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L. *Food Chem Toxicol* 2010; 48(1): 441-7.
- Bhatia K, Rahman S, Ali M, et al. In vitro antioxidant activity of *Juglans regia* L. bark extract and its protective effect on cyclophosphamide-induced urotoxicity in mice. *Redox Rep* 2006; 11(6): 273-9.
- Crawford, RS, Mudaliar SR, Henry, et al. Inhibition of LDL oxidation in vitro but not ex vivo by troglitazone. *Diabetes* 1999; 48(4): 783-90.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
- Navder KP, Baraona E, Leo MA, et al. Oxidation of LDL in baboons is increased by alcohol and attenuated by polyenylphosphatidylcholine. *J Lipid Res* 1999; 40(6): 983-7.
- Seven A, Civelek S, Inci E, et al. Evaluation of oxidative stress parameters in blood of patients with laryngeal carcinoma. *Clin Biochem* 1999; 32(5): 369-73.
- Ahmadvand H, Khosrobeigi A, Bagheri S, et al. Comparison of Inhibitory effects of *Satureja Khuzistanica* oil extract, vitamin E and Coenzyme Q10 on LDL oxidation in vitro. *Yafteh* 2008; 11(4): 25-31. (Persian)
- Lloyd DR, Phillips DH. Oxidative DNA damage mediated by copper(II), iron(II) and nickel(II) fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links. *Mutat Res* 1999; 424(1-2): 23-36.
- Gutteridge JM. Inhibition of the Fenton reaction by the protein caeruloplasmin and other copper complexes. Assessment of ferroxidase and radical scavenging activities. *Chem Biol Interact* 1985; 56(1): 113-20.
- Sheu JY, Chen PH, Tseng WC, et al. Spectrophotometric determination of a thiobarbituric acid-reactive substance in human hair. *Anal Sci* 2003; 19(6): 957-60.
- Carvalho M, Ferreira PJ, Mendes VS, et al. Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L. *Food and Chem Toxicol* 2010; 48(1): 441-7.
- Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, et al. Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46(6): 2103-11.
- Almeida IF, Fernandes E, Jose LFC, et al. Walnut (*Juglans regia*) leaf extracts are strong scavengers of pro-oxidant reactive species. *Food Chem* 2008; 106(3): 1014-20.
- Oliveira I, Sousa A, Ferreira IC, et al. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *Food Chem Toxicol* 2008; 46(7): 2326-31.

## The inhibitory effects of Walnut (*Juglansregia L.*) huskhydroalcoholic extract on LDL oxidation in vitro

Ahmadvand H<sup>\*1,2</sup>, Khosrobeigi A<sup>2</sup>, Shahsavari Gh<sup>2</sup>, Abdolapour F<sup>2</sup>, Bagheri Sh<sup>2</sup>, Rashidi M<sup>1,3,4</sup>

Received: 06/13/2010

Revised: 03/26/2011

Accepted: 03/27/2011

1. Razi Herbal Medicine Research Center, School of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khoramabad, Iran
2. Dept. of Biochemistry, School of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khoramabad, Iran
3. Dept. of Chemistry, Islamic Azad University, Khoramabad Branch, Khoramabad, Iran
4. Young Researchers Club, Islamic Azad University, Khoramabad Branch, Khoramabad, Iran

---

Journal of Jahrom University of Medical Sciences, Vol. 9, No. 3, Fall 2011

### Abstract

#### Introduction:

Oxidation of low-density lipoprotein (LDL) has been strongly implicated in the pathogenesis of atherosclerosis. The use of antioxidant compounds in dietary food stuff including vitamin E and herbal extract such as Walnut (*Juglansregia L.*) husks hydroalcoholic extract (W) may lead to inhibition of the production of oxidized LDL and may decrease both the development and the progression of atherosclerosis. The present study is an attempt to determine the effects of W on LDL oxidation induced-CuSO<sub>4</sub> quantitatively in vitro.

#### Material and Methods:

Fasting blood samples were collected from normal people after an overnight fasting and then LDL was isolated. LDL was incubated without CuSO<sub>4</sub> as control and with CuSO<sub>4</sub> and several concentration of W (0.2, 2 and 20 µg/ml); the formation of conjugated dienes, lag time and Malondialdehyde (MDA) were measured. Inhibition of this Cu-induced oxidation was studied in the presence of several concentrations of W.

#### Results:

It was demonstrated that W is able to decrease CuSO<sub>4</sub>-induced LDL oxidation. Walnut (*Juglansregia L.*) huske extract led to an increase rate of 87%, 178% and 202% lag time at concentrations ranging from 0.2 µg/ml to 20 µg/ml, respectively. The inhibitory effects of W on LDL oxidation were dose-dependent at concentrations ranging from 0.2 µg/ml to 20 µg/ml.

#### Conclusion:

This study showed that W prevented the oxidation of LDL in vitro and it can be concluded that it might have similar effects in vivo.

**Keywords:** Walnut, LDL, In Vitro

---

\*Corresponding author, Email: hassan\_a46@yahoo.com