

ORIGINAL ARTICLE

Histopathological Effects of Sodium Nitrite on Renal Artery in Rats

Fatemeh Juibar¹,
Saeed Khatamsaz²,
Leili Sepehrara²

¹ MSc Student in Biology, Islamic Azad University, Kazerun Branch, Kazerun, Iran
² Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad University, Kazerun Branch, Kazerun, Iran

(Received January 7, 2013 ; Accepted June 8, 2013)

Abstract

Background and purpose: Nitrite is the material used in industry for storing food specially sausage and ham. Fast foods which contain high levels of nitrite are widely eaten throughout the world. Nitrite is also found in water, soil and ecosystem, and could highly influence human's health. This study was performed to examine the histopathological effect of sodium nitrite on renal artery in rats.

Materials and methods: This study included 60 adult male and female Wistar rats, divided into six groups of 10. They were examined for 60 days, and were assigned into the following groups: 175 mg/kg/day dose recipient group, 350 mg/kg/day dose recipient group and control group which absorbed nitrite through drinking water. At the end of day 60, after anesthesia blood sample was collected from the heart. The arteries were taken out of the body, then tissue sections were prepared to identify the tissue changes. The samples were stained with Hematoxilin Eozin method and thickness of intima media was measured with image tool software. In both sexes, we checked morphometric and morphologic features of the arteries, body weight changes before and after the test and blood NOx level. The data was then analyzed using SPSS ver. 17.

Results: The outcome of NOx plasmatic density measurement showed that NOx level significantly increased in animal's blood in 175 mg/kg/day dose recipient group and 350 mg/kg/day dose recipient group compared with the control group ($P \leq 0.05$). Also, in both sexes the thickness of media layer decreased significantly in the 350 mg/kg/day dose recipient group.

Conclusion: According to the results, nitrite in different dose could increase the amount of blood NOx and renal artery intima media thickness could reduce by 350 mg/kg sodium nitrite. Existence of nitrite in foods can cause vascular problems in consumers, therefore, it could be considered as a threatening factor in vascular system.

Keywords: Sodium nitrite, renal artery, histopathological effects, nitric oxide, rat

J Mazand Univ Med Sci 2013; 23(102): 86-94 (Persian).

اثرات هیستو پاتولوژیکی نیتریت سدیم بر سرخرگ کلیوی موش صحرایی

فاطمه جویبار^۱

سعید خاتم ساز^۲

لیلی سپهرآرا^۲

چکیده

سابقه و هدف: نیتریت، ماده مورد استفاده در صنعت می باشد که جهت نگهداری مواد غذایی به خصوص سوسیس و کالباس مورد استفاده قرار می گیرد. با توجه به مصرف زیاد غذاهای فست فود در جامعه و بالا بودن نیتریت در آنها و همچنین وجود این ماده مضر در آب، خاک و اکوسيستم، سلامتی بسیاری از انسانها را به خطر می اندازد. لذا مطالعه حاضر جهت بررسی اثرات هیستو پاتولوژیکی نیتریت سدیم بر سرخرگ کلیوی موش صحرایی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشی بر اساس جنسیت ۶۰ سرموش صحرایی نر و ماده بالغ نژاد ویستان را به طور تصادفی به شش گروه ۱۰ تابی تقسیم کردند سپس آنها را به مدت ۶۰ روز تحت مداخله قرار دادیم. که به گروه دریافت کننده با دوز حداقل نیتریت سدیم (۱۷۵ mg/kg/day)، گروه دریافت کننده دوز حداکثر نیتریت سدیم (۳۵۰ mg/kg/day) و گروه کنترل تقسیم شدند. موش‌های صحرایی نیتریت سدیم را از طریق آب شرب دریافت می کردند. در پایان روز ۶۰ پس از بیهودی و خون‌گیری مستقیم از قلب، سرخرگ کلیوی از بدن حیوان خارج و سپس جهت بررسی تغییرات بافتی از آنها، مقاطعه بافتی تهیه گردید. رنگ آمیزی نمونه‌ها به روش هماتوکسیلین-ائوزین صورت پذیرفت و ضخامت لایه میانی (Intima media thickness) نیز توسط نرم افزار Image tool اندازه گیری شد. فاکتورهای نظیر ویژگی‌های بافت‌شناسی (مورفومنتریک و مورفولوژیک) سرخرگ، تغییرات وزن بدن در قبل و بعد از آزمایش و میزان NOx خون در هر دو جنس مورد بررسی قرار گرفت. در انتها نتایج به دست آمده به وسیله نرم افزار SPSS17 مورد بررسی آماری قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان NOx خون حیوانات در هر دو جنس، در گروه دریافت کننده با دوز ۳۵۰ میلی گرم بر کیلو گرم نیتریت سدیم و گروه دریافت کننده با دوز ۱۷۵ میلی گرم بر کیلو گرم در مقایسه با گروه کنترل خود، به صورت معنی‌داری افزایش یافته است ($p < 0.05$). همچنین ضخامت لایه میانی در گروه نر و ماده دریافت کننده دوز ۳۵۰ میلی گرم نیتریت سدیم، در سطح معنی‌دار نسبت به گروه کنترل خود کاهش یافته است ($p < 0.05$).

استنتاج: براساس نتایج حاصل، نیتریت سدیم در دوزهای مختلف میزان NOx خون را افزایش داد و در دوز ۳۵۰ میلی گرم نیتریت سدیم باعث کاهش ضخامت لایه میانی سرخرگ کلیوی گردید؛ لذا با توجه به مطالعه حاضر به نظر می‌رسد که وجود نیتریت در مواد غذایی می‌تواند مشکلات عروقی را در افراد مصرف کننده ایجاد نماید و به عنوان یک عامل تهدید کننده سیستم عروقی به حساب آید.

واژه‌های کلیدی: نیتریت سدیم، سرخرگ کلیوی، نیتریک اکساید، موش صحرایی، اثرات هیستوپاتولوژیکی

مقدمه

در گذشته یون نیتریت را از لحاظ فیزیولوژیکی خنثی و بدون اثر دانستند و فقط به عنوان محصول نهایی

و پایانی NO به حساب می‌آوردن، اما امروزه شواهد نشان می‌دهد که نیتریت در مرکز پیچیده حساس

E-mail: bita2005_m2004@yahoo.com

مؤلف مسئول: فاطمه جویبار - کازرون: دانشگاه آزاد اسلامی، کدپستی: ۷۳۱۹۶-۹۳۸۸۴

۱. کارشناسی ارشد زیست شناسی علوم جانوری گرایش فیزیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، کازرون، ایران
 ۲. دکترای زیست شناسی علوم جانوری، فیزیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، گروه زیست شناسی، کازرون، ایران
- تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۰/۱۸ تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۲/۱۶

پلاسمانیز پس از مصرف نیترات افزایش می‌یابد^(۵-۷). در حقیقت میزان سمیت نیتریت نسبت به نیترات، ده برابر بیشتر می‌باشد و باعث مشکلاتی از قبیل مت هموگلوبین^(۳) هپیرترووفی ناحیه زونا گلومروزای آدرنال (در موش‌های صحرایی) و شواهدنا معلومی از سرطان زایی مانند سرطان کبد مثانه، ریه و مری می‌شود^(۴). طی بررسی انجام شده گزارش کردند که افزایش مصرف نیترات و نیتریت‌ها تغییرات پاتولوژیک را در بافت کبدی القا، می‌کند^(۶). همچنین نیتریت سدیم در بافت کلیه منجر به اتساع و جمع شدن خون در گلومرول‌ها و پیش گلومرول‌ها می‌شود و در قسمت لومن توبول‌ها (پروکسیمال و توبول‌های بهم پیچیده دیستال) گشادشده‌گی همراه با تحلیل رفتگی سلول‌ها را ایجاد می‌کند^(۲).

Kenyatta Cosby و همکارانش نشان دادند که نیتریت همانند یک مخزن بیولوژیکی برای NO عمل می‌کند^(۸); از طرفی Alef و همکارانش به این تیجه دست یافتند که رژیم غذایی حاوی نیتریت می‌تواند بر تعديل پر سلولی شدن غشا درونی رگ‌ها تأثیر بگذارد^(۹).

Borbely و همکارانش نیز گزارش دادند که پروکسی نیتریت، α -اکتین‌های موجود در میوکاردیوم قلب را مورد هدف قرار می‌دهد و نیتروژن‌دار شدن α -اکتین، اختلال در انقباض قلب را ایجاد می‌کند^(۱۰).

علی‌رغم این که این ماده بر روی سیستم قلبی و عروقی تأثیرگذار بوده^(۱۱) و در صنایع غذایی، دارویی و شیمیایی مصرف گسترده‌ای دارد و همچنین در جوامع امروزی نیز در فست فودها و آفت‌کش‌ها به طور بی‌رویه مورد استفاده قرار گرفته است، اما تاکنون مطالعه‌ای در زمینه بررسی اثرات هیستوپاتولوژیکی بر بافت سرخرگ صورت نگرفته است، لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات هیستوپاتولوژیکی نیتریت سدیم و تأثیرات آن بر سرخرگ کلیوی می‌باشد. از آنجایی که اندازگیری لایه مدیا (IMT) روش استاندارد تشخیص عوامل خطر سیستم قلبی عروقی

هیبوکسی و انتقال پیام شیمیایی و همچنین در مرکز واکنش‌های اکسیداسیون و احیا قرار گرفته است و می‌تواند به رادیکال بسیار فعال و بیولوژیکی NO_x احیاء و یا به آنیون نیترات اکسید تبدیل شود^(۱). امروزه استفاده از افزودنی‌ها در مواد غذایی بسیار افزایش یافته است و انسان‌ها به طور گسترده‌ای در معرض با این نگهدارنده‌ها قرار گرفته‌اند^(۲). همچنین به دلیل ارتقاء کیفیت و محافظت از آلودگی‌های میکروبی، به طور گسترده‌ای از نیترات و نیتریت در محصولات گوشتی فرآوری شده استفاده می‌شود^(۳). در بسیاری از مواقع نیز به دلیل نبودن زمین‌های حاصل خیز و محدود بودن سطح زیر کشت، مصرف کودهای نیتروژن دار از جایگاه خاصی برخوردار است و روزانه با ورود مقادیر بالایی از این مواد به آب، خاک و اکوسیستم‌ها سلامتی بسیاری از انسان‌ها به خطر می‌افتد^(۴). مقادیر نیترات و نیتریت شاخص‌های مهمی برای ارزیابی کیفیت آب می‌باشند، از این رو آب می‌تواند از طریق احیاء نیترات منبع مهم نیتریت محسوب شود^(۵). همچنین طی چند دهه اخیر، به تدریج در بسیاری از جوامع اروپایی غلظت نیترات موجود در آب‌ها نیز افزایش یافته است و حتی در بعضی مواقع غلظت نیترات نسبت به بیست سال قبل دو برابر شده است، حتی در نتیجه فعالیت‌های کشاورزی غلظت نیترات و نیتریت می‌تواند به آسانی به چند صد میلی گرم در لیتر برسد^(۶).

در گونه‌های مختلف جانوران سرعت جذب نیترات و نیتریت توسط دستگاه گوارش متفاوت می‌باشد. به طوری که سرعت جذب در دستگاه گوارش انسان‌ها و رات‌ها نسبتاً زیاد بوده اما در نشخوارکنندگان سرعت جذب کمتر می‌باشد. نیترات‌ها و نیتریت‌ها در اکثر گونه‌ها از قسمت بالایی روده-شکمبه به خوبی جذب می‌شوند و بعد از مصرف یک وعده غذایی سرشار از نیترات، سطح این ماده در پلاسمای افزایش یافته و تا مدت طولانی در آن حد باقی می‌ماند (نیمه عمر پلاسمایی نیترات ۶-۵ ساعت می‌باشد); علاوه بر این میزان نیتریت

پروتئین زدایی ۴۰۰ میکرو لیتر نمونه با ۶ میلی گرم پودر سولفات روی مخلوط گردید و پس از مخلوط شدن به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند؛ و از محلول فوقانی جهت اندازگیری (NOx) استفاده شد(۱۲). سپس به ۱۰۰ میکرو لیتر سرم پروتئین زدایی شده در میکرو پلیت الیزا ۱۰۰ میکرو لیتر محلول کلرید و آنادیوم اضافه شد و ۵۰ میکرو لیتر سولفانامید (۱/۰ گرم در ۵ میلی لیتر اسید کلرید ریک ۵ درصد) و NEDD-1naphtyl متعاقب آن ۵۰ میکرو لیتر N ethylenediamine (۰/۰۰۵ گرم در ۵ میلی لیتر آب مقطر) افزوده شد و بعد از آن به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد تحت انکوبه قرار گرفت. بعد از انجام واکنش گریس و تشکیل جذب رنگ، جذب نوری حاصل از تشکیل ماده رنگی در ۵۴۰ nm توسط دستگاه خوانش گر الیزا خوانده و با استفاده از منحنی استاندارد غلظت نمونه‌ها محاسبه شد. نحوه اندازگیری ضخامت لایه میدیا در سرخرگ‌های مختلف:

با استفاده از برنامه Image tool ضخامت لایه میدیا اندازگیری شد. با استفاده از این نرم افزار ضخامت لایه میدیا حداقل در ۵ نقطه بر حسب میکرومتر محسوب شد و این کار برای تمام مقاطع بافتی صورت گرفت.

محاسبات آماری

پس از ثبت داده‌ها در نرم افزار SPSS 17، جهت ارزیابی غلظت‌های مختلف نیتریت سدیم بر میزان نیتریت اکساید خون و تاثیر آن بر ضخامت لایه میانی سرخرگ، از آنالیز واریانس یک طرفه و برای مقایسه وزن قبل و بعد از اتمام دوره آزمایش، از آزمون t وابسته استفاده شد ($p < 0.05$) به عنوان اختلاف معنی‌دار آماری گزارش شد ($p < 0.05$).

یافته‌ها

بعد از اتمام دوره آزمایش، در تمام گروه‌ها وزن موش‌های صحراوی نسبت به قبل افزایش داشته که این

محسوب می‌شود(۱۲) بنابراین ضخامت لایه میدیا نیز به دلیل بررسی بیشتر مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش آزمایشی از ۶۰ سرموش صحراوی نر و ماده بالغ از نژاد ویستار به ترتیب با وزن تقریبی 210 ± 12 گرم و سن حدود ۳-۴ ماه استفاده شد که از خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی اهواز تهیه و در شرایط آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی دانشگاه آزاد کازرون نگهداری شدند. موش‌های صحراوی در ۶ گروه ده‌تایی به شرح زیر طبقه‌بندی شدند:

(۱) گروه کنترل: در طی آزمایش، روزانه از آب آشامیدنی شهرستان کازرون و غذای استاندارد آزمایشگاهی (رژیم سالم و طبیعی) به طور آزادانه استفاده می‌کردند و تحت هیچ گونه تیمار خاصی قرار نگرفتند.

(۲) گروه تیمار با دوز حداقل: روزانه مقدار ۱۷۵ میلی گرم به ازای یک کیلو گرم وزن بدن خود نیتریت سدیم به صورت محلول در آب آشامیدنی شهرستان کازرون و رژیم غذایی سالم و طبیعی دریافت می‌کردند.

(۳) گروه تیمار با دوز حداکثر: روزانه مقدار ۳۵۰ میلی گرم به ازای یک کیلو گرم وزن بدن خود نیتریت سدیم به صورت محلول در آب آشامیدنی شهرستان کازرون به همراه رژیم غذایی سالم و طبیعی دریافت می‌کردند که این سه گروه برای هر دو جنس موجود بود.

پس از دوره ۶۰ روزه تیمار، در روز ۶۱ موش‌ها توسط مهار کننده و دستگاه مقید کننده توزین شدند و بعد با استفاده از پنبه آگشته به اتر در جار بیهوشی، بیهوش گردیدند. از حیوان بیهوش شده خون گیری به عمل آمد و سرخرگ کلیوی چپ و راست را بیرون آورده و پس از شست و شو با سرم فیزیولوژی، برای تهیه مقاطع بافتی در فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفتند. سپس جداسازی سرم صورت گرفت و سرم‌ها در دمای ۱۸-۱۸ فریز شدند.

اندازگیری میزان نیتریک اکساید خون (NOx) سرم طبق واکنش گریس در میکرو پلیت الیزا انجام شد. برای

که در گروه حداکثر در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی داری را نشان می دهد ($p < 0.05$). همچنان در جنس ماده میانگین ضخامت لایه میانی در گروه کنترل $311 \pm 2/56$ میکرومتر، در گروه دریافت کننده دوز حداقل (175 mg/kg/day)، $314 \pm 2/60$ میکرومتر و در گروه دریافت کننده دوز حداکثر (350 mg/kg/day)، $255 \pm 1/10$ میکرومتر می باشد، که در گروه حداکثر در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی داری را نشان می دهد ($p < 0.05$). در مقایسه میانگین تغییرات کمی ضخامت لایه میانی در سرخرگ کلیوی در میان گروه های یکسان در جنس های نر و ماده هیچ گونه اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($p > 0.05$).

نتایج مربوط به مطالعات میکروسکوپ نوری بافت سرخرگ های کلیوی

مطالعات میکروسکوپی بر روی سرخرگ کلیوی گروه دریافت کننده دوز حداکثر نر و ماده حاکی از تغییرات لایه مدیا نسبت به گروه حداقل و کنترل خود می باشد. بدین صورت که در هر دو جنس گروه دریافت کننده 350 میلی گرم بر کیلو گرم، لایه مدیا نسبتاً نامنظم و حالت غیر یکنواخت را نشان می دهد و مناطقی با تجمع قابل توجه لتفویسیت نیز در لایه مدیا قابل مشاهده می باشد، در صورتی که این ناهنجاری ها به طور واضح در گروه دریافت کننده 175 میلی گرم بر کیلو گرم دیده نشده است.

نتایج مربوط به تغییرات کمی ضخامت لایه میانی دیواره سرخرگ کلیوی در جنس نر گروه های کنترل، دریافت کننده دوز 350 mg/kg/day و دریافت کننده دوز 175 mg/kg/day در پایان آزمایش روز س testim می دهد. همان گونه که در تصاویر شماره 1 و 2 ملاحظه می شود، در گروه کنترل ظاهر تمام لایه ها کاملاً منظم، یکنواخت و ضخامت نرمال برابر ($347 \pm 2/53 \mu\text{m}$) را داشته و در تصاویر شماره 3 و 4 که مربوط به گروه دریافت کننده دوز 175 میلی گرم بر کیلو گرم می باشد، مشاهده می شود

افزایش وزن فقط در گروه کنترل معنی دار بود ($p < 0.05$)، اما در پایان آزمایش میانگین وزن کلیه گروه ها با گروه کنترل خود اختلاف معنی داری را نشان نمی داد.

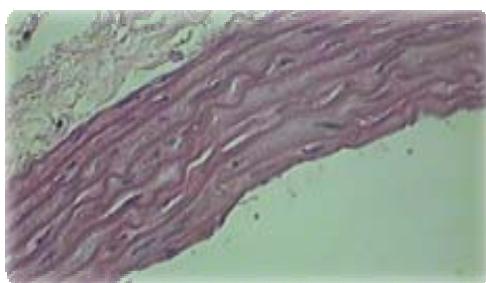
تغییرات غلظت NO_x خون

در جنس نر میزان میانگین NO_x در گروه تیمار با دوز 175 میلی گرم بر کیلو گرم $30.6 \pm 2.2 / 13$ میکرومول، در گروه تیمار با دوز 350 میلی گرم بر کیلو گرم $50.1 \pm 2.7 / 74$ میکرومول و میانگین غلظت $31.3 \pm 3.0 / 7$ NO_x در گروه کنترل $27.0 \pm 2.7 / 31$ میکرومول بود که میزان NO_x در گروه حداکثر و حداقل نسبت به گروه کنترل خود افزایش معنی داری را نشان می دهد ($p < 0.05$).

همچنان در جنس ماده، میزان میانگین NO_x در گروه تیمار با دوز 175 میلی گرم بر کیلو گرم برابر با $35.0 \pm 2.7 / 31$ میکرومول، در گروه تیمار با دوز $27.0 \pm 2.7 / 31$ میلی گرم بر کیلو گرم برابر با $42.4 \pm 2.7 / 92$ میکرومول و میانگین غلظت پلاسمایی طبیعی NO_x در گروه کنترل $25.6 \pm 2.7 / 16$ میکرومول بود که میزان نیتریت در هر دو گروه حداکثر و حداقل نسبت به گروه کنترل خود افزایش معنی داری را نشان می دهد ($p < 0.05$). در مقایسه میان گروه های کنترل، گروه های تجربی دریافت کننده دوز حداقل (نیتریت سدیم) و گروه تجربی دریافت کننده دوز حداکثر در دو جنس نر و ماده، هیچ گونه اختلاف معنی داری وجود نداشته است.

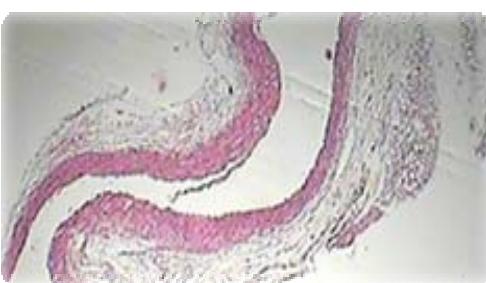
نتایج مربوط به تغییرات کمی ضخامت لایه میانی دیواره سرخرگ کلیوی

در جنس نر میانگین ضخامت لایه میانی در گروه کنترل $316 \pm 1/21$ میکرومتر، در گروه دریافت کننده دوز حداقل (175 mg/kg/day)، $220 \pm 1/13$ میکرومتر و در گروه دریافت کننده دوز حداکثر (350 mg/kg/day)، $245 \pm 1/10$ میکرومتر می باشد،

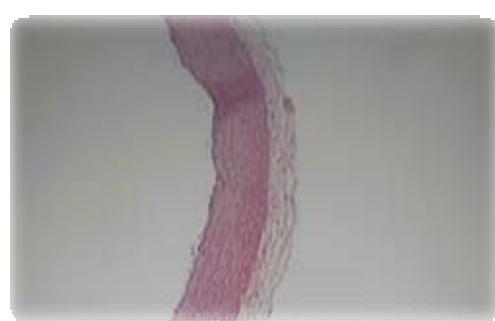


تصویر شماره ۴: سرخرگ کلیوی در گروه دریافت کننده دوز ۱۷۵ میلی گرم بر کیلو گرم (جنس نر) $\times 400$

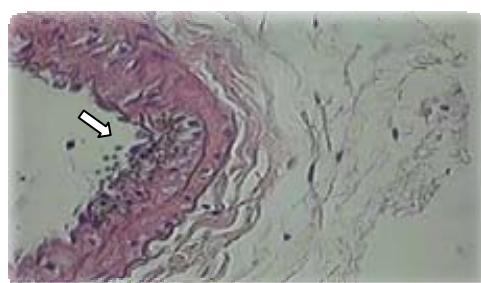
که تمام لایه‌ها کاملاً منظم، یکنواخت و ضخامت نرمال برابر $1/10$ (340 ± 4 μm) بوده و تغییرات هیستوپاتولوژیکی خاصی دیده نمی‌شود. تصاویر شماره ۵ و ۶ که متعلق به گروه دریافت کننده ۳۵۰ میلی گرم بر کیلو گرم می‌باشد ظاهر تمام لایه‌ها را نسبتاً نامنظم، غیر یکنواخت و ضخامت لایه مدببا را برابر $1/81$ (277 ± 70 μm) را نشان می‌دهد.



تصویر شماره ۵: سرخرگ کلیوی در گروه دریافت کننده دوز ۳۵۰ میلی گرم بر کیلو گرم (جنس نر) $\times 100$



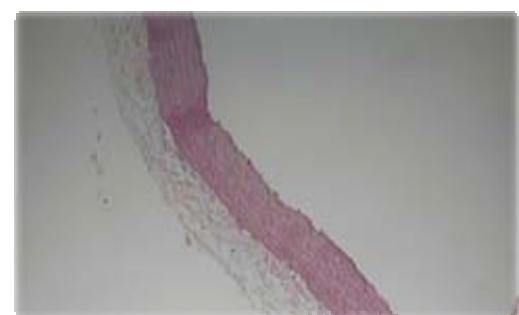
تصویر شماره ۱: سرخرگ کلیوی در گروه کنترل (جنس نر) $\times 100$



تصویر شماره ۶: سرخرگ کلیوی در گروه دریافت کننده دوز ۳۵۰ میلی گرم بر کیلو گرم (جنس نر) پیکان تجمع لنفوسيت را نشان می‌دهد. $\times 400$

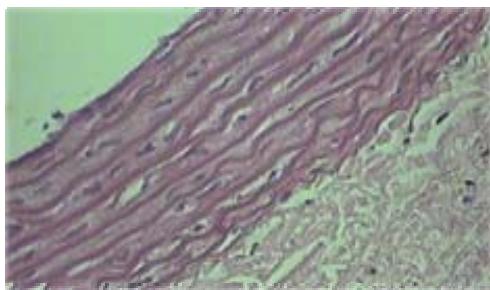


تصویر شماره ۲: سرخرگ کلیوی در گروه کنترل (جنس نر) $\times 400$



تصویر شماره ۳: سرخرگ کلیوی در گروه دریافت کننده دوز ۱۷۵ میلی گرم بر کیلو گرم (جنس نر) $\times 100$

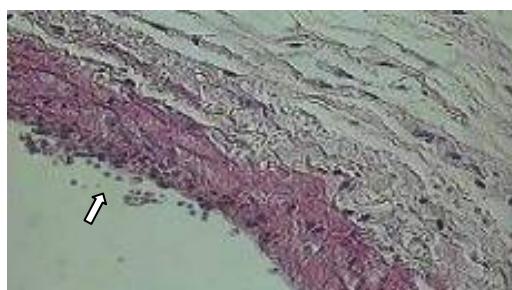
فتو میکرو گراف نوری مقطعی از شریان کلیوی در جنس ماده در گروه‌های کنترل، دریافت کننده دوز ۳۵۰ mg/kg/day و دریافت کننده دوز ۱۷۵ mg/kg/day که در تصاویر شماره ۷ و ۸ ملاحظه می‌شود، در گروه کنترل ظاهر تمام لایه‌ها کاملاً منظم، یکنواخت و ضخامت



تصویر شماره ۱۰: سرخرگ کلیوی در گروه دریافت کننده دوز ۱۷۵ میلی گرم بر کیلو گرم (جنس ماده) $\times 400$



تصویر شماره ۱۱: سرخرگ کلیوی در گروه دریافت کننده دوز ۳۵۰ میلی گرم بر کیلو گرم (جنس ماده) $\times 100$

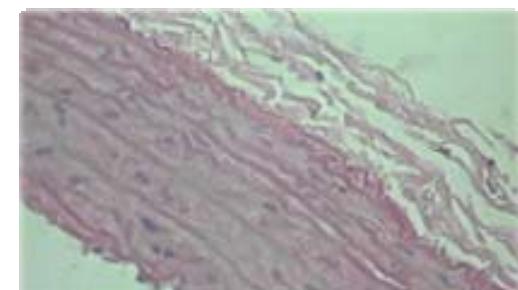


تصویر شماره ۱۲: سرخرگ کلیوی در گروه دریافت کننده دوز ۳۵۰ میلی گرم بر کیلو گرم (جنس ماده) پیکان تجمع لنفوسيت را نشان می دهد. $\times 400$

نرمال برابر $۳۱۱/۱۱ \pm ۲/۵۶$ μm بوده و در تصاویر شماره ۹ و ۱۰ که مربوط به گروه دریافت کننده دوز ۱۷۵ میلی گرم بر کیلو گرم می باشد، مشاهده می شود تمام لایه ها کاملاً منظم، یکنواخت و ضخامت نرمال برابر $۳۱۴/۵۷ \pm ۲/۶$ μm را داشته و تغییرات هیستوپاتولوژیکی خاصی دیده نمی شود. اما در تصاویر شماره ۱۱ و ۱۲ که متعلق به گروه دریافت کننده ۳۵۰ میلی گرم بر کیلو گرم می باشد، ظاهر تمام لایه ها نسبتاً نامنظم، غیر یکنواخت و ضخامت لایه مادی را برابر $۲۵۵/۱ \pm ۶/۱۵$ μm نشان می دهد.



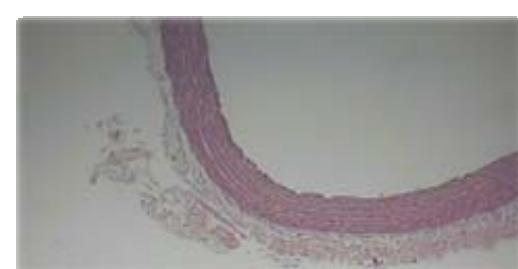
تصویر شماره ۱۳: سرخرگ کلیوی در گروه کنترل (جنس ماده) $\times 100$



تصویر شماره ۱۴: سرخرگ کلیوی در گروه کنترل (جنس ماده) $\times 400$

بحث

در مطالعه حاضر میانگین وزن بدن گروه کنترل در پایان آزمایش نسبت به زمان شروع آزمایش به طور معنی داری افزایش یافت و گروه کنترل نسبت به گروه های دریافت کننده نیتریت و حتی گروه حداقل نسبت به گروه حداقل، اضافه وزن بیشتری را داشته است، اما این داده ها معنی دار نشده اند. بر اساس



تصویر شماره ۱۵: سرخرگ کلیوی در گروه دریافت کننده دوز ۱۷۵ میلی گرم بر کیلو گرم (جنس ماده) $\times 100$

دربافت نیتریت سدیم با مقادیر حداقل و حداکثر از طریق آب شرب، در پایان آزمایش نشان داده که تغییرات معنی‌داری در میانگین ضخامت لایه مدیا حیوانات در گروه‌های تیمار شده نسبت به گروه کنترل ایجاد شده است.

در مطالعات انجام شده توسط Ono و همکارانش، گزارش شده که با استفاده از داروی Candesartan، ضخامت لایه میانی سرخرگ کاروتید کاهش می‌یابد و این کاهش را به دلیل افزایش میزان NO در بدن توصیف کرد. در مطالعه حاضر نیز میزان NO خون به‌طور معنی‌داری افزایش یافته و بر اساس داده‌های Ono، این افزایش غلظت NO می‌تواند کاهش ضخامت لایه میانی را القا کند^(۱۷). هم‌چنین القا مرگ سلوی در لایه میانی و میتوکندری‌ها توسط نیتریک اکساید و پروکسی نیتریت نیز می‌تواند از عوامل کاهش ضخامت لایه میانی محسوب شود^(۱۸). مطالعات میکروسکوپی بر روی سرخرگ کلیوی در گروه حداکثر نر (۳۵۰ mg/kg/day) حاکی از تغییرات لایه مدیا نسبت به گروه حداقل و کنترل می‌باشد، بدین صورت که در گروه حداکثر، لایه مدیا نسبتاً نامنظم و حالت غیر یکنواخت را نشان می‌دهد و مقادیری از تجمع لنفوسيت در این لایه به وفور یافت می‌شود؛ در صورتی که این ناهنجاری‌ها در گروه حداقل به طور واضح دیده نشده است. اثرات سمیت NO به طور مستقیم، نسبتاً زیاد نمی‌باشد اما در اثر واکنش با سوپر اکساید‌ها و تشکیل پروکسی نیتریت، اثر سمیت آن به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد. پروکسی نیتریت به طور نسبتاً آهسته با بیش‌تر مولکول‌های بیولوژیک واکنش داده و به عنوان یک اکسید کننده انتخابی شناخته شده است. پروکسی نیتریت، تیروزین پروتئین‌ها را تغییر داده و نیتروزین‌ها را به وجود می‌آورد که در بدن نیز قابل تشخیص می‌باشند. نیتروژن دار کردن ساختاری پروتئین‌ها از قیل نروفیلامان‌ها و اکتین، باعث از هم گسیختگی مجموعه فیلامانی شده و در نتیجه باعث بیماری‌های عرضی می‌شود.

گزارشات نیتریت همانند یک مخزن بیولوژیکی برای NO عمل می‌کند^(۸). در این پژوهش نیز میانگین غلظت پلاسمایی NOx در گروه‌های دریافت کننده مقادیر مختلف نیتریت سدیم نسبت به گروه کنترل خود در هر دو جنس به طور معنی‌داری افزایش یافته است.

در مطالعه‌ای که توسط Karen و همکارانش انجام گرفت گزارش داده شد که مصرف نیتریت سدیم به صورت محلول در آب آشامیدنی، میزان نیتریت و نیترات در پلاسماء، بافت قلب و کبد را افزایش می‌دهد^(۱۳). در مطالعه حاضر نیز به دلیل مصرف نیتریت سدیم میزان نیتریک اکساید خون در موش‌های صحرایی افزایش یافته است.

در این مطالعه، در مقایسه گروه‌های یکسان در دو جنس متفاوت، هیچ گونه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در مطالعه انجام شده توسط قاسمی و همکارانش نشان دادند که سطوح سرمی متابولیت‌های اکسید نیتریک (NOx) در زنان و مردان و یا در میان گروه‌های سنی مختلف تفاوت معنی‌داری وجود ندارد^(۱۴) هم چنین Watanabe و همکارانش گزارش داده‌اند که در میان گروه‌های سنی مختلف مردان از نظر میزان NOx، تفاوت معنی‌داری وجود ندارد^(۱۵).

علاوه بر این Peinado و همکارانش در مطالعه‌ای نشان داده‌اند که بیش‌ترین میزان سطح سرمی NOx در مردان ۴۱ تا ۵۰ ساله دیده می‌شود، حال آن که افزایش میزان سطح سرمی NOx در زنان تنها بعد از یائسگی اتفاق می‌افتد^(۱۶).

با توجه به مطالعات انجام شده و از آن جایی که در مطالعه حاضر موش‌های صحرایی نر و ماده، جوان بوده و در یک حیطه سنی قرار داشته‌اند، بیش‌ترین تغییرات میزان NOx در سینین پیری و در زنان در یائسگی اتفاق می‌افتد، در مقایسه غلظت NOx سرم در گروه‌های مختلف (کنترل، حداقل و حداکثر) نر و ماده داده‌ها معنی‌دار نبودند و نتایج این مطالعه با مطالعات قبلی انجام شده توسط Watanabe و قاسمی هم خوانی داشت^(۱۵, ۱۶).

بر روی سیستم قلبی و عروقی تأثیر می‌گذارد و باعث ایجاد و راهاندازی پروسه مرگ سلولی می‌شوند و آسیب‌هایی از قبیل اتصال پلاکت‌ها و منوست‌ها، ترومبوسیت و آسیب‌های بافتی را به وجود آورده و باعث اتساع عروق می‌شوند که این اتساع در ماهیچه صاف عروق وابسته به کاهش f-اکتین و افزایش محتوی G-اکتین می‌باشد و حالت غیر یکنواخت لایه مدیا در گروه تجربی ۳۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم می‌تواند ناشی از تأثیر نیتریک اکساید و پروکسی نیتریت بر سیستم قلبی و عروقی باشد. بدین ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که به طور کلی تأثیر نیتریت سدیم خوراکی در سرخرگ کلیوی دو جنس متفاوت، یکسان می‌باشد. هم‌چنین به نظر می‌رسد اصلی‌ترین مکانیسم ایجاد تأثیرات نیتریت خوراکی بر بافت‌شناسی سرخرگ‌ها از طریق تولید یون‌های پروکسی نیتریت و نیز نیتریک اکساید می‌باشد. در نتیجه می‌توان گفت که وجود نیتریت در مواد غذایی می‌تواند در افراد مصرف کننده مشکلات عروقی را ایجاد نماید و به عنوان یک عامل تهدید کننده سیستم عروقی به حساب آید.

References

1. Dezfulian C, Raat N, Shiva S, Gladwin MT. Role of the anion nitrite in ischemia-reperfusion cytoprotection and therapeutics. *Cardiovasc Res* 2007; 75(2): 327-38.
2. Abd El-Tawab M, Ismail-Ashraf MM, Gamal Abd El-Rhman B. Microscopic studies of the effect of some food additives on the kidney of albino rat. *Egypt J Hosp Med* 2003; 12: 12-27.
3. Lundberg JO. Cardiovascular prevention by dietary nitrate and nitrite. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 296(5): H1221-H1223.
4. Nassehi Nia HR, Mehdi Nia M, Ghorbani R, Norispehr M. Nitrite concentration in distributed sausage in Semnan Province. *Payesh Health Monitor* 2008; 7: 3 (Persian).
5. Alexander J, Benford D, Cockburn A, Cravedi JP, Dogliotti E, Di Domenico A, et al. Nitrite as undesirable substances in animal feed[1] - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain. *Efsa J* 2009; doi:10.2903/j.efsa.2009.1017
6. Ogur R, Coskun O, Korkmaz A, Oter S, Yaren H, Hasde M. High nitrate intake impairs liver functions and morphology in rats; protective effects of α-tocopherol. *Environ Toxicol Pharmacol* 2005; 20(1): 161-166.

می‌شود(۱۹). پروکسی نیتریت (ONO-O⁻) به طور آزادانه از غشاء دو لایه فسفو لیپیدی عبور می‌کند و با مولکول‌های هدف زیادی از قبیل لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA واکنش می‌دهد که در نهایت از طریق Necrosis و یا Apoptosis منجر به مرگ سلولی می‌شود(۲۰).

Ma در طی تحقیقات خود گزارش داد که دلیل اصلی آسیب لایه اندوتیال و ماهیچه‌های صاف عروق تحت شرایط پاتولوژیک، تولید زیاد پروکسی نیتریت (ONO-O⁻) در دیواره عروق می‌باشد(۲۰).

Maneen در مطالعاتی بر روی موش صحرایی نشان داد که پروکسی نیتریت از طریق دیلیمرازسیون f-اکتین بر روی بافت عضلانی صاف سرخرگ‌های مغزی تأثیر می‌گذارد. پروکسی نیتریت باعث اتساع عروق می‌شود که این اتساع وابسته به کاهش f-اکتین در ماهیچه صاف عروق و افزایش محتوی G-اکتین می‌باشد(۲۰)؛ هم‌چنین منجر به غیرفعال شدن پروکسی نیتریت α-اکتین در میوسیت‌های قلبی می‌گردد(۲۱). به طور کلی بر اساس مطالعات انجام شده، پروکسی نیتریت و نیتریک اکساید به وسیله مکانیسم‌های مختلف

7. Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7(2): 156-67.
8. Cosby K, Partovi KS, Crawford JH, Patel RP, Reiter CD, Martyr S, et al. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med* 2003; 9(12): 1498-1505.
9. Alef MJ, Carchman E, Gladwin MT, Tzeng E, Zuckerbraun BS. Dietary nitrates and nitrites modulate vascular intimal hyperplasia. *J Am Coll Surg* 2010; 211(3): 138.
10. Borbély A, Tóth A, Edes I, Virág L, Papp JG, Varró A, et al. Peroxynitrite-induced alpha-actinin nitration and contractile alterations in isolated human myocardial cells. *Cardiovasc Res* 2005; 67(2): 225-233.
11. Ma XL, Gao F, Nelson AH, Lopez BL, Christopher TA, Yue TL, et al. Oxidative inactivation of nitric oxide and endothelial dysfunction in stroke-prone spontaneous hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 298(3): 879-885.
12. Litwin M, Niemirska A. Intima-media thickness measurements in children with cardiovascular risk factors. *Pediatr Nephrol* 2009; 24(4): 707-719.
13. Stokes KY, Dugas TR, Tang Y, Garg H, Guidry E, Bryan NS. Dietary nitrite prevents hypercholesterolemic microvascular inflammation and reverses endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 296(5): H1281–H1288.
14. Ghasemi A, Hedayati M, Khoushbaten A. Evaluation of a simple and rapid method for serum nitric oxide determination using microplate. *Iranian J Endocrinol metab (IJEM)*; 2005; 7(supplement4): 433-439 (Persian).
15. Watanabe T, Akishita M, Toba K, Kozaki K, Eto M, Sugimoto N, et al. Influence of sex and age on serum nitrite/nitrate concentration in healthy subjects. *Clin Chim Acta* 2000; 301(1-2): 169-179.
16. Peinado MA, López-Ramos JC, Camacho MV, Molina FJ, Martínez-Romero R, Hernández R, et al. Age and sex-related serum changes in nitric oxide: correlations with serological markers. *Int J Cardiol* 2007; 121(1): 88-90.
17. Ono H, Minatoguchi S, Watanabe K, Yamada Y, Mizukusa T, Kawasaki H, et al. Candesartan decreases carotid intima-media thickness by enhancing nitric oxide and decreasing oxidative stress in patients with hypertension. *Hypertens Res* 2008; 31(2): 271-279.
18. Li J, Li W, Su J, Liu W, Altura BT, Altura BM. Peroxynitrite induces apoptosis in rat aortic smooth muscle cells: possible relation to vascular diseases. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004; 229(3): 264-249.
19. Beckman J, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxy nitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996; 271(5 Pt 1): C1424-37.
20. Maneen MJ, Hannah R, Vitullo L, DeLance N, Cipolla MJ. Peroxynitrite diminishes myogenic activity and is associated with decreased vascular smooth muscle F-Actin in rat posterior cerebral arteries. *Stroke* 2006; 37(3): 894-899.
21. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric Oxide and peroxy nitrite in Health and Disease. *Physiol Rev* 2007; 87(1): 315- 424.