

اثر دریافت اسکوربیک اسید بر میزان متابولیت‌های نیتریک اکساید و فشار خون سیستولی بدنبال مواجهه با سرب در موش بزرگ آزمایشگاهی

محمد امانی^ک M.Sc، علی نوروززاده^{*} M.Sc، علیرضا عسگری^{**} Ph.D، علی خوش باطن^{* Ph.D}

چکیده

هدف: مواجهه مداوم با سطوح پائین سرب باعث افزایش فشارخون در انسان و نمونه‌های حیوانی میگردد. فشارخون ناشی از سرب تا حدودی با افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و عوامل اکسیدان نظیر ROS و کاهش نیتریک اکساید (NO) در دسترس ارتباط دارد. در این مطالعه تأثیر دریافت اسکوربیک اسید (ویتامین C) را بعنوان یک آنتی اکسیدان بر میزان متابولیت‌های نیتریک اکساید و فشارخون سیستولی بدنبال مواجهه با سرب بررسی کردیم.

مواد و روشها: موش‌های صحرایی نر نژاد Wistar با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم در چهار گروه کنترل، گروه مصرف کننده استات سرب (۱۰۰ ppm در آب آشامیدنی)، گروه مصرف کننده استات سرب (۱۰۰ ppm در آب آشامیدنی) بعلاوه اسکوربیک اسید (یک گرم در لیتر آب آشامیدنی) و گروه مصرف کننده اسکوربیک اسید (یک گرم در لیتر آب آشامیدنی) تقسیم بندی شدند. اندازه گیری فشارخون سیستولی با استفاده از دستگاه اسفیگمومانومتر PE300 از ناحیه دم حیوان انجام گرفت. اندازه گیری میزان نیتریک اکساید سرم بصورت غیر مستقیم و از طریق اندازه گیری متابولیت‌های پایدار آن یعنی نترات و نیتريت کل (NOx) به روش اسپکتروفوتومتری و با استفاده از واکنش گریس (Griess) انجام گرفت.

یافته‌ها: پس از دوازده هفته مصرف استات سرب بطور معنی داری فشارخون سیستولی را نسبت به گروه کنترل افزایش داد. دریافت اسکوربیک اسید مانع از افزایش فشارخون سیستولی بدنبال مواجهه با سرب گردید بطوریکه اختلاف معنی داری نسبت به گروه کنترل وجود نداشت. میزان NOx سرم در گروه مصرف کننده استات سرب کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل نشان داد، در حالیکه در گروه‌هایی که علاوه بر استات سرب اسکوربیک اسید نیز دریافت کرده بودند اختلاف معنی داری در میزان NOx سرم نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان میدهد که دریافت اسکوربیک اسید میتواند با مکانیسم جلوگیری از کاهش میزان NOx سرم مانع از افزایش فشارخون ناشی از سرب گردد.

واژه‌های کلیدی: اسکوربیک اسید، نیتریک اکساید، فشارخون، سرب

پذیرش: ۸۷/۶/۱۱

دریافت: ۸۷/۴/۸

کهن‌نویسنده مسئول: گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، مرکز آسیب‌های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)

* گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)

** گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، مرکز آسیب‌های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)

۱. مقدمه

مواجهه مزمن با سطوح پائین سرب باعث افزایش پایدار فشارخون در انسان و نمونه‌های حیوانی میگردد که حتی بعد از مواجهه با سرب نیز باقی می ماند (۱۲). هیپرتانسیون ناشی از سرب ارتباط زیادی با استرس اکسیداتیو و افزایش تولید (Reactive Oxygen) ROS (Species) توسط سرب دارد، مواجهه با سرب حتی در دوزهای پایین باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد نظیر یون سوپراکسید، پراکسید هیدروژن، رادیکال اکسیژن و رادیکال هیدروژن می شود (۳-۵). استرس اکسیداتیو از طریق غیر فعال نمودن نیتریک اکساید (NO) بوسیله ROS نقش اصلی را در ایجاد بیماری هیپرتانسیون ناشی از سرب ایفاء می کند. کاهش استرس اکسیداتیو با استفاده از آنتی اکسیدان‌ها می تواند باعث کاهش فشار خون و افزایش نیتریک اکساید (NO) در هیپرتانسیون ناشی از سرب شود (۶و۷). اسکوربیک اسید (ویتامین C) یک آنتی اکسیدان مهم در پلاسما و غشاهای سلولی محسوب می شود، این ویتامین محلول در آب بوده است و در میوه و سبزیجات به مقدار زیاد وجود دارد، اسکوربیک اسید می تواند رادیکال‌های آزاد بویژه یون سوپراکسید را از محیط بردارد و نیتریک اکساید (NO) را از طریق محافظت از آن در برابر اکسیداسیون و نیز بالابردن میزان سنتز آن از طریق افزایش فعالیت endothelial Nitric Oxide Synthase) eNOS (افزایش دهد. اسکوربیک اسید همچنین ممکن است باعث کاهش حساسیت عروقی به نوراپی نفرین و افزایش گشادی عروقی وابسته به اندوتلیوم از طریق افزایش میزان نیتریک اکساید شود (۸-۱۲).

با توجه به نقش رادیکال‌های آزاد در ایجاد فشار خون ناشی از سرب، بکارگیری یک آنتی اکسیدان میتواند در کاهش فشار خون ناشی از مواجهه با سرب مفید باشد. در مطالعه حاضر تأثیر اسکوربیک اسید به عنوان یک آنتی اکسیدان بر تغییرات فشار خون ناشی از اثرات کوتاه مدت (۸ و ۴ هفته) و تحت مزمن (۱۲ هفته) مواجهه با غلظت پایین استات سرب (۱۰۰ ppm) و نیز تغییرات سطح متابولیت‌های نیتریک اکساید (NO) یعنی نیتريت و نترات کل (NOx) و نیز تغییرات وزن حیوانات بررسی شده است.

۲. مواد و روش‌ها:

در این مطالعه موش‌های صحرایی نر نژاد Wistar با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شدند. حیوانات بطور تصادفی در چهار گروه مختلف کنترل (CNTL)، گروه دریافت کننده اسکوربیک اسید (AA)، گروه دریافت کننده استات سرب (Ld) و گروه دریافت کننده استات سرب به علاوه اسکوربیک اسید (Ld+AA) قرار گرفتند. با توجه به نتایج مطالعات قبلی اسکوربیک اسید با غلظت ۱ گرم در لیتر و استات سرب با غلظت ۱۰۰ ppm بصورت محلول در آب آشامیدنی به حیوانات مورد نظر داده شد. گروه دریافت کننده اسکوربیک اسید از آب آشامیدنی حاوی اسکوربیک اسید با غلظت ۱ گرم در لیتر استفاده می نمودند. گروه دریافت کننده استات سرب از آب آشامیدنی حاوی ۱۰۰ ppm استات سرب مصرف می کردند و گروه دریافت کننده استات سرب به علاوه اسکوربیک اسید از آب آشامیدنی حاوی اسکوربیک اسید با غلظت ۱ گرم در لیتر و استات سرب با غلظت ۱۰۰ ppm استفاده می نمودند. تغییرات میزان متابولیت‌های نیتریک اکساید (NO) یعنی نترات و نیتريت کل (NOx) و میزان فشار خون و نیز تغییرات وزن حیوانات در گروه‌های مختلف آزمایشی در شروع آزمایش و در هفته‌های چهارم، هشتم و دوازدهم اندازه گیری شدند و میزان اسکوربیک اسید سرم در گروه‌های مختلف آزمایشی نیز اندازه گیری گردید.

حیوانات در شرایط یکسان و دمای مناسب حیوانخانه و شرایط تاریکی-روشنایی ۱۲ ساعته و دسترسی آسان به آب و غذا نگهداری شدند. حیواناتی که برای اندازه گیری میزان NOx استفاده می شدند برای اندازه گیری فشارخون استفاده نشدند و برای آزمایش اندازه گیری فشار خون از حیوانات جداگانه ای استفاده شد.

۲.۱. اندازه گیری فشار خون

اندازه گیری میزان فشار خون حیوانات قبل از شروع داروهای مصرفی و سپس در هفته‌های چهارم، هشتم و دوازدهم انجام شد، به این صورت که ابتدا حیوان با استفاده از ترکیب کتامین و گزیلازین (به ترتیب ۵۰ و ۷ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن) بیهوش و سپس فشار خون سیستمی با استفاده از دستگاه فیزیوگراف نارکو MKIII اندازه گیری شد.

اسید توسط Cu^{2+} به دهیدرواسکوربیک اسید اکسید شد و سپس با ترکیب حلقوی دی نیترو فنیل هیدرازین در حالت اسیدی واکنش داده و ماده رنگی را تشکیل شد که در طول موج ۵۲۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر قابل اندازه گیری بود (۱۶).

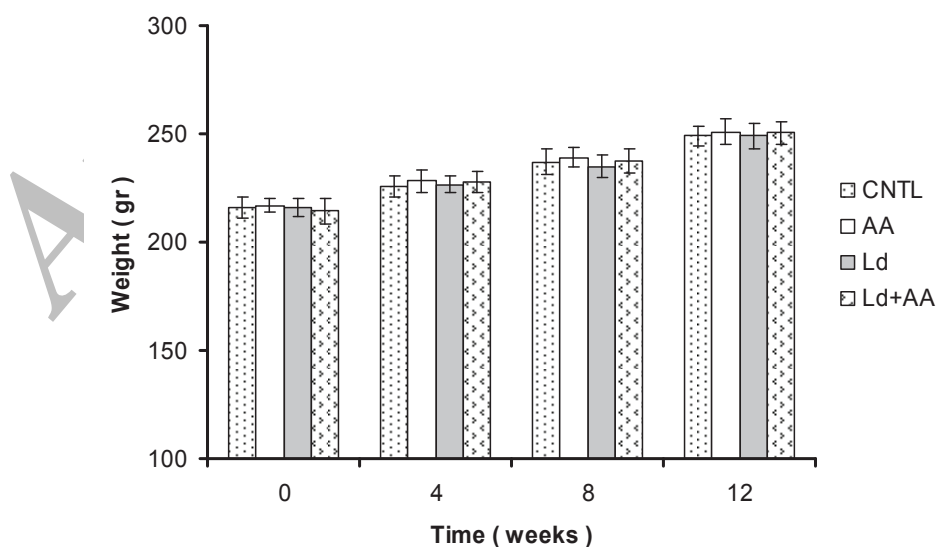
۳. روش آنالیز داده‌ها:

در این مطالعه به منظور مقایسه میانگین داده‌ها در هر گروه با گروه کنترل از آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و بدنبال آن پس آزمون Tukey-HSD استفاده شد. برای مقایسه میانگین یک گروه در هفته‌های مختلف با یکدیگر از repeated measurement استفاده شد. نتایج بصورت $Mean \pm SEM$ بیان شده و $P < 0.05$ به عنوان مرز معنی داری تفاوت‌ها در نظر گرفته شد.

۴. نتایج:

۴.۱. وزن حیوانات

وزن حیوانات در شروع آزمایش و در هفته‌های چهارم، هشتم و دوازدهم در گروه‌های مختلف آزمایشی تفاوت معنی داری نسبت به گروه کنترل نداشته است و دریافت استات سرب و اسکوربیک اسید بر وزن حیوانات بی تأثیر بود (شکل ۱).



شکل ۱: وزن حیوانات گروه‌های مختلف آزمایشی قبل از شروع داروها و در هفته‌های چهارم، هشتم و دوازدهم آزمایش.

۲.۲. اندازه گیری میزان نیتریک اکساید

اندازه گیری نیتریک اکساید بطور غیر مستقیم و از طریق اندازه گیری متابولیت‌های پایدار آن یعنی نیترات و نیتريت کل (NOx) انجام گرفت. همبستگی بالایی میان تولید نیتریک اکساید در بدن و سطح نیترات و نیتريت کل (NOx) در سرم، پلاسما و ادرار وجود دارد (۱۳). رایج ترین روش اندازه گیری متابولیت‌ها، روش کالریتری با استفاده از واکنش گریس است، اساس این واکنش تشکیل یک کروموفور از دی آزوتاسیون یک سولفانیل آمید به کمک نیتريت در محیط اسیدی و ترکیب آن با یک آمین دو حلقه‌ای مثل NEDD (N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride) است (۱۴). در این مطالعه نیترات موجود در نمونه‌ها با استفاده از کلرید وانادیوم (III) (VCl_3) به نیتريت تبدیل شد، سپس از دی آزوتاسیون سولفانیل آمید به کمک نیتريت در محیط اسیدی و کونژوگاسیون آن با آمین دو حلقه‌ای NEDD، ماده رنگی تولید و جذب نوری آن در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد و با استفاده از منحنی استاندارد به دست آمده غلظت نمونه‌ها محاسبه گردید (۱۵).

۲.۳. اندازه گیری میزان اسکوربیک اسید

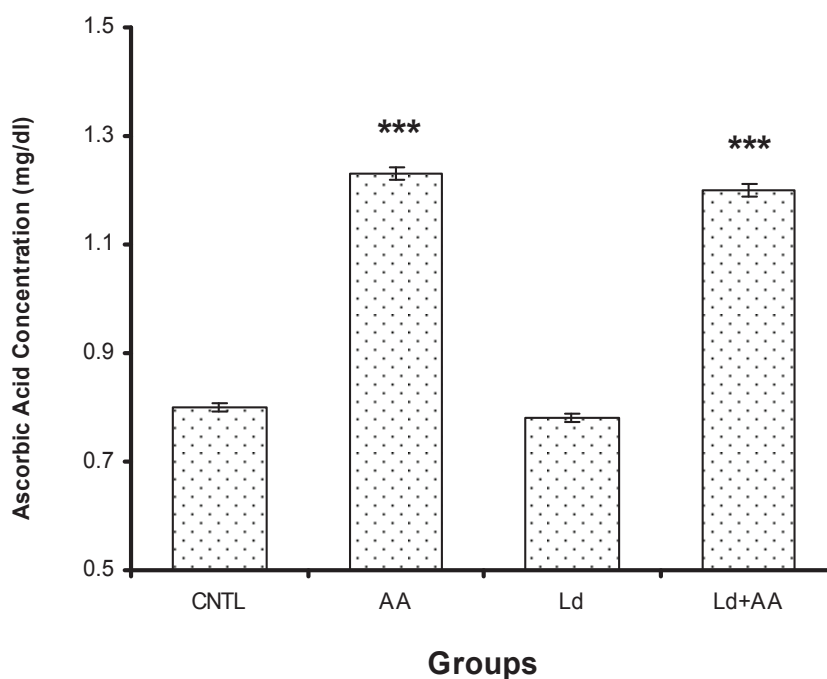
برای اندازه گیری میزان اسکوربیک اسید سرم ابتدا اسکوربیک

۴.۲. اسکوربیک اسید

میزان اسکوربیک اسید سرم در گروه دریافت کننده اسکوربیک اسید در هفته دوازدهم برابر $1/23 \pm 0/01$ میلی گرم در دسی لیتر بود که افزایش معنی داری ($P < 0.001$) را نسبت به گروه کنترل نشان داد و این میزان در گروه مصرف کننده استات سرب به همراه اسکوربیک اسید در هفته دوازدهم برابر $1/2 \pm 0/01$ میلی گرم در دسی لیتر بود و افزایش معنی داری ($P < 0.001$) را در میزان اسکوربیک اسید سرم نسبت به گروه کنترل و گروه دریافت کننده استات سرب نشان داد. سطح اسکوربیک اسید سرم در گروه دریافت کننده اسکوربیک اسید و در گروه دریافت کننده استات سرب و اسکوربیک اسید نزدیک به هم بود و تفاوت معنی داری نداشت. میزان اسکوربیک اسید سرم در گروه کنترل و گروه دریافت کننده استات سرب به ترتیب برابر $0/78 \pm 0/007$ و $0/8 \pm 0/008$ میلی گرم در دسی لیتر بود (شکل ۲).

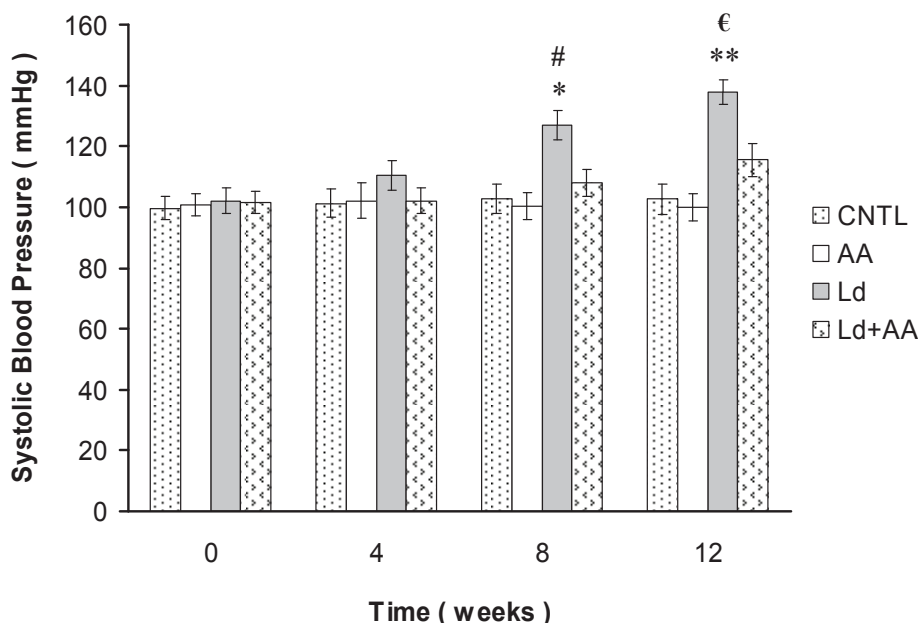
۴.۳. فشارخون

فشارخون گروه مصرف کننده استات سرب قبل از شروع آزمایش برابر $102/14 \pm 4/38$ میلی متر جیوه بود که در پایان هفته چهارم علیرغم افزایش فشارخون ($110/28 \pm 4/88$ میلی متر جیوه) در گروه استات سرب اختلاف معنی داری نسبت به فشارخون گروه کنترل ($101/28 \pm 4/55$ میلی متر جیوه) مشاهده نگردید. ادامه مصرف استات سرب باعث افزایش بیشتر فشارخون گردید بطوریکه در هفته هشتم اختلاف معنی داری ($P < 0.05$) بین فشارخون گروه مصرف کننده استات ($127/14 \pm 4/83$ میلی متر جیوه) و گروه کنترل ($90/90$ میلی متر جیوه) وجود داشت. فشارخون گروه مصرف کننده استات سرب در هفته دوازدهم به $137/85 \pm 4/14$ میلی متر جیوه افزایش یافت که افزایش معنی داری ($P < 0.01$) را نسبت به فشارخون گروه کنترل ($102/57 \pm 5/04$ میلی متر جیوه) نشان می داد. در گروههایی که علاوه بر استات سرب، اسکوربیک اسید نیز



شکل ۲: میزان اسکوربیک اسید سرم در گروههای مختلف آزمایشی (هفته دوازدهم).

(*) اختلاف نسبت به گروه کنترل، (***) $P < 0.001$ Mean \pm S.E.M, n=7)



شکل ۳: میزان فشار خون سیستولی در گروه‌های مختلف آزمایشی. (*) اختلاف نسبت به گروه کنترل، (#) اختلاف نسبت به گروه استات سرب در هفته چهارم، (€) اختلاف نسبت به گروه استات سرب در هفته هشتم (Mean±SEM, N=7) (*, #, €: P<0.05, **: P<0.01)

کنترل اختلاف معنی داری وجود نداشت (شکل ۴).

بحث و نتیجه‌گیری:

مطالعه حاضر نشان می‌دهد که دریافت اسکوربیک اسید می‌تواند از طریق جلوگیری از اکسیداسیون NO بوسیله عوامل ROS مانع از بروز فشارخون بالای ناشی از سرب گردد. در این مطالعه دریافت استات سرب و اسکوربیک اسید بصورت محلول در آب آشامیدنی هیچ تأثیری بر میزان آب مصرفی و دریافت غذا و وزن حیوانات مورد آزمایش نداشت. در مطالعه ای که توسط کریمی و همکاران (۱۹۹۸) انجام شد نتایج مشابهی بدست آمده است (۱۷).

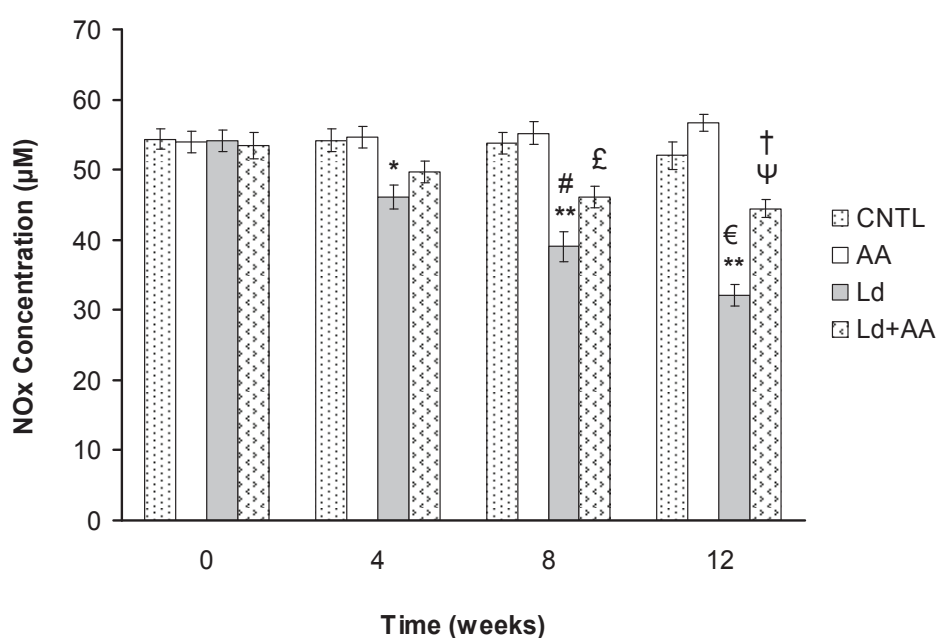
در مطالعه حاضر فشارخون سیستولی در گروه دریافت کننده استات سرب در هفته چهارم اگرچه افزایش یافت ولی این تغییر نسبت به گروه کنترل معنی دار نبود. ادامه مصرف استات سرب باعث افزایش فشارخون در هفته‌های هشتم و دوازدهم گردید، بطوریکه در هفته دوازدهم فشارخون نسبت به هفته هشتم نیز افزایش معنی داری را نشان می‌داد و این نتایج مشابه نتایج تحقیقات Ding و همکاران

دریافت کرده بودند اختلاف معنی داری در فشارخون سیستولی نسبت به گروه کنترل مشاهده نگردید. همچنین بین فشارخون گروه‌هایی که فقط از اسکوربیک اسید استفاده می‌نمودند و فشارخون گروه کنترل تفاوت معنی داری وجود نداشت (شکل ۳).

۴.۴. نیتریک اکسید

میزان NOx در گروه مصرف کننده استات سرب در هفته چهارم برابر $46/05 \pm 1/69$ میکرومول در لیتر بود که کاهش معنی داری ($P<0.05$) نسبت به میزان NOx گروه کنترل ($54/18 \pm 1/63$) میکرومول در لیتر) داشت. ادامه مصرف استات سرب باعث کاهش بیشتر NOx گردید بطوریکه به صورت معنی داری ($P<0.01$) در هفته هشتم به $39/03 \pm 2/10$ میکرومول در لیتر و در هفته دوازدهم به $32/12 \pm 1/57$ میکرومول در لیتر کاهش یافت.

میزان NOx در گروه‌هایی که علاوه بر استات سرب، اسکوربیک اسید نیز دریافت کرده بودند نسبت به گروه کنترل تغییر چندانی نداشت و تفاوت معنی داری نشان نداد. همچنین بین میزان NOx در گروه‌هایی که فقط اسکوربیک اسید دریافت کرده بودند و گروه‌هایی



شکل ۴: میزان غلظت متابولیت های نیتریک اکساید (NOx) سرم در گروه های مختلف آزمایشی. (*) اختلاف نسبت به گروه کنترل، (#) اختلاف نسبت به گروه اسکوربیک اسید در هفته صفر، (£) اختلاف نسبت به گروه استات سرب در هفته چهارم، (£) اختلاف نسبت به گروه مصرف کننده استات سرب بعلاوه اسکوربیک اسید در هفته صفر، (†) اختلاف نسبت به گروه مصرف کننده استات سرب بعلاوه اسکوربیک اسید در هفته چهارم، (‡) اختلاف نسبت به گروه استات سرب در هفته دوازدهم (*, #, £, P<0.05, **, €, †, ‡, P<0.01 Mean±SEM, N=7)

چه میزان NOx در گروه های دریافت کننده استات سرب بعلاوه اسکوربیک اسید نسبت به گروه کنترل اختلاف دارد ولی به نظر می رسد مصرف اسکوربیک اسید تا حدودی توانسته است که از کاهش بیش از اندازه میزان NOx جلوگیری نماید بطوریکه اختلاف معنی داری بین گروه استات سرب بدون مصرف اسکوربیک اسید و گروه مصرف کننده استات سرب به همراه اسکوربیک اسید مشاهده می شود. با این وجود در این مطالعه دریافت اسکوربیک اسید نتوانست بطور کامل مانع از کاهش NOx ناشی از مصرف استات سرب شود، زیرا کاهش معنی داری در میزان NOx گروه دریافت کننده استات سرب بعلاوه اسکوربیک اسید در هفته هشتم نسبت به میزان NOx گروه دریافت کننده استات سرب بعلاوه اسکوربیک اسید در زمان شروع آزمایش وجود داشت. همینطور کاهش معنی داری در میزان NOx گروه دریافت کننده استات سرب بعلاوه اسکوربیک اسید در هفته دوازدهم نسبت به میزان NOx گروه دریافت کننده استات سرب بعلاوه اسکوربیک اسید در هفته چهارم مشاهده شد.

(۱۹۹۸) بود (۱۸). در این مطالعه دریافت اسکوربیک اسید با غلظت یک گرم در لیتر در آب آشامیدنی مانع از افزایش معنی دار فشارخون بدنبال مصرف استات سرب در هفته های هشتم و دوازدهم شده است. هر چند در ظاهر چنین به نظر می رسد که این ممانعت بطور کامل صورت نگرفته است، اما در نهایت اختلاف معنی داری بین فشارخون گروه دریافت کننده استات سرب بعلاوه اسکوربیک اسید و فشارخون گروه کنترل مشاهده نگردید.

در مطالعه حاضر میزان NOx سرم در گروه دریافت کننده سرب در هفته چهارم کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل داشت و میزان NOx در هفته های هشتم و دوازدهم کاهش بیشتری داشته است، بطوری که بیشترین کاهش میزان NOx را در هفته دوازدهم شاهد بودیم. میزان NOx در هفته چهارم در گروهی که علاوه بر استات سرب، اسکوربیک اسید نیز دریافت کرده بودند اختلاف معنی داری نسبت به گروه کنترل نداشت و اسکوربیک اسید مانع از کاهش میزان NOx در هفته چهارم گردید. در هفته های هشتم و دوازدهم نیز اگر

5. Ding Y, Gonick HC, Vaziri ND. Lead-induced hypertension: Increased hydroxyl radical production. *Am J Hypertension* 2001; 14: 169-73.
6. Vaziri ND, Liang K, Ding Y. Increased nitric oxide inactivation by reactive oxygen species in lead-induced hypertension. *Kidney International* 1999; 56: 1492-8.
7. Gurer H, Ercal N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 927-45.
8. Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee J, et al. Vitamin C as an antioxidant: Evaluation of its role in disease prevention. *J Am College Nutr* 2003; 22: 18-35.
9. Annon H, Joseph A, Richard C, John F, Keaney J. Ascorbic acid enhances endothelial nitric oxide synthase activity by increasing intracellular tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem* 2000; 275: 17399-406.
10. Newaz MA, Yousefipour Z, Nawal N. Modulation of nitric oxide synthase activity in brain, liver, and blood vessels of spontaneously hypertensive rats by ascorbic acid: protection from free radical injury. *Clin Exp Hypertens* 2005; 27: 497-508.
11. Uscio L, Milstien S, Richardson D, Smith L, Katusic Z. Long-term vitamin C treatment increases vascular tetrahydrobiopterin levels and nitric oxide synthase activity. *Circ Res* 2003; 92: 88-95.
12. Ettarh R, Odigie I, Adigun S. Vitamin C lowers blood pressure and alters vascular responsiveness in salt-induced hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* 2002; 80: 1199-200.
13. Granger D, Taintor R, Boockvar K, Hibbs J. Measurement of nitrate and nitrite in biological

در مطالعات اخیر ارتباط زیادی بین سطح سرب خون و بیماری فشارخون نشان داده شده است، فشارخون بالا در هر دو حالت حاد و مزمن مواجهه با سرب گزارش شده است. در بسیاری از مطالعات مواجهه مزمن با سطوح پایین سرب باعث افزایش پایدار در فشارخون شده است (۱۹۹۰ و ۲۰). فشارخون ناشی از سرب ارتباط زیادی با افزایش تولید رادیکالهای آزاد و تغییرات در متابولیسم نیتریک اکساید دارد (۲۱ و ۲۲). همچنین چنین استنباط می شود که تغییرات در میزان نیتریک اکساید خون تنها عامل دخیل در ایجاد فشارخون ناشی از سرب نبوده است و عوامل دیگری غیر از نیتریک اکساید از قبیل تغییر در فعالیت ACE و یا تغییر در میزان آنژیوتانسین II (Ag II)، اندوتلین و تغییرات پاسخدهی عروقی می توانند دخیل باشند (۲۳ و ۲۴).

نتایج این مطالعه نشان میدهد که احتمالاً یکی از مکانیسمهای عمده دخیل در فشارخون ناشی از سرب کاهش در میزان نیتریک اکساید در دسترس بوده است و دریافت اسکوربیک اسید میتواند از طریق مهار اکسیداسیون نیتریک اکساید و در نتیجه افزایش میزان نیتریک اکساید در دسترس مانع از فشارخون بالای ناشی از سرب گردد.

References:

1. Sharp DS, Becker CE, Smith AH. Chronic low-level lead exposure. Its role in the pathogenesis of hypertension. *Med Toxicol* 1987; 2: 210-32.
2. Harlan WR. The relationship of blood lead levels to blood pressure in the U.S. population. *Environ Health Perspect* 1988; 78: 9-13.
3. Vaziri ND. Pathogenesis of lead-induced hypertension: Role of oxidative stress. *J Hypertension* 2002; 20: 15-20.
4. Zhenmin NI, Stephen Hou, Cyril H, Nosratola DV. Lead exposure raises superoxide and hydrogen peroxide in human endothelial and vascular smooth muscle cells. *Kidney International* 2004; 66: 2329-36.

- in lead-induced hypertension: Effect of lazardol therapy. *Kidney Int* 1997; 52: 1042-6.
23. Sharifi AM, Darabi R, Akbarloo N, Larijani B, Khoshbaten A. Investigation of circulatory and tissue ACE activity during development of lead-induced hypertension. *Toxicol Lett* 2004; 153: 233-8.
24. Heydari A, Norouzzadeh A, Khoshbaten A, Asgari A, Ghasemi A, Najafi S, Badalzadeh R. Effects of short-term and subchronic lead poisoning on nitric oxide metabolites and vascular responsiveness in rat. *Toxicol Lett* 2006; 166: 88-94.
- samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Methods Enzymol* 1996; 268: 142-51.
14. Sun J, Zhang X, Broderick M, Fein H. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. *Sensors* 2003; 3: 276-84.
15. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 2001; 5: 62-71.
16. Roe JH. Ascorbic acid. In: *The Vitamins*. Gyorgy P and Pearson WN. New York, Acad Press; 1976. pp. 27-51.
17. Karimi GR, Khoshbaten A, Abdollahi M, Sharifzadeh M, Namiranian KH, Dehpour AR. Effects of subacute lead acetate administration on nitric oxide and cyclooxygenase pathways in rat isolated aortic ring. *Pharmacol Res* 2002; 46: 31-7.
18. Ding Y, Vaziri ND, Gonick HC. Lead induced hypertension: Response to sequential infusions of L-arginine, superoxide dismutase and nitroprusside. *Environ Res* 1998; 76: 107-13.
19. Sharp DS, Osterloh J, Becker CE, et al. Blood pressure and blood lead concentration in bus drivers. *Environ Health Perspect* 1998; 78:131-7.
20. Nowack R, Wiecek A, Exner B, Gretz N, Ritz E. Chronic lead exposure in rats: Effects on blood pressure. *Eur J Clin Invest* 1993; 23: 433-43.
21. Kasperczyk S, Birkner E, Kasperczyk A, Zalejska J. Activity of superoxide dismutase and catalase in people protractedly exposed to lead compounds. *J Ann Agric Environ Med* 2004; 11: 291-6.
22. Vaziri ND, Ding Y, Ni Z, et al. Altered nitric oxide metabolism and increased oxygen free radical activity