



ISMJ 2016; 19(2): 225-233

دوماهنامه طب جنوب

پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

سال نوزدهم/ شماره ۲، صفحه ۲۳۳ - ۲۲۵ (خرداد و تیر ۱۳۹۵)

## بررسی اثرات نیتريت سدیم خوراکی بر تغییرات بافت‌شناسی سرخرگ آئورت در موش‌های صحرائی نر بالغ

سعید خاتم‌ساز<sup>۱\*</sup>، فاطمه جویبار<sup>۲</sup><sup>۱</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، ایران<sup>۲</sup> باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

(دریافت مقاله: ۹۳/۸/۳۰ - پذیرش مقاله: ۹۴/۲/۲۷)

### چکیده

زمینه: با توجه به مصرف زیاد نیتريت در غذاهای آماده در جامعه و بالا بودن میزان نیتريت در آب، خاک و اکوسیستم، نیتريت می‌تواند سلامتی بسیاری از انسان‌ها را به خطر اندازد در مطالعه حاضر اثرات نیتريت سدیم بر سرخرگ آئورت در موش‌های صحرائی نر بالغ بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر ۳۰ سر موش صحرائی نر بالغ نژاد ویستار به طور تصادفی به سه گروه ۱۰ تایی تقسیم شد که شامل گروه دریافت کننده دوز حداقل (۱۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن/روز) و گروه دریافت کننده دوز حداکثر نیتريت سدیم (۳۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن/روز) و گروه کنترل بودند. سپس آن‌ها را به مدت ۶۰ روز تحت مداخله قرار گرفتند. موش‌های صحرائی نیتريت سدیم را از طریق آب آشامیدنی دریافت می‌کردند. در پایان آزمایش موش‌ها را به جار بیهوشی منتقل و سپس با رعایت اصول یوتناژی پس از بیهوشی با اتر خونگیری از قلب صورت گرفت، سرخرگ آئورت از بدن حیوان خارج، و جهت بررسی تغییرات بافتی، از آن مقاطع بافتی تهیه شد و فاکتورهایی نظیر ویژگی‌های بافت‌شناسی (مورفومتريک و مورفولوژیک) سرخرگ، مورد بررسی قرار گرفتند. رنگ‌آمیزی نمونه‌ها به روش ماسون تری کروم و هماتوکسیلین اتوزین انجام شد. ضخامت لایه‌ی میانی (Internal media) توسط نرم‌افزار Image tool اندازه‌گیری گردید. میزان نیتريك اکساید خون نیز سنجیده شد. و در انتها نتایج به‌دست آمده به وسیله نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۷ و تست ANOVA مورد بررسی آماری قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ضخامت لایه میانی سرخرگ آئورت در گروه دریافت کننده نیتريت سدیم با دوز بالا و پایین در سطح معنی‌دار نسبت به گروه کنترل خود کاهش یافته است ( $p \leq 0/05$ ) و در گروه دریافت کننده ۳۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم لایه مدیا نسبتاً نامنظم و حالت غیر یکنواخت را نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری: براساس نتایج حاصل نیتريت سدیم می‌تواند در دراز مدت اثرات مخرب را بر بافت سرخرگ آئورت القا کند.

واژگان کلیدی: نیتريت سدیم، سرخرگ آئورت، موش صحرائی، نیتريك اکساید

\* کازرون، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، ایران

E-mail:saeed1617@yahoo.com

## مقدمه

امروزه مصرف نیترات‌ها و نیتريت‌ها به عنوان نگهدارنده در بسیاری از محصولات غذایی افزایش چشمگیری یافته است. نیترات‌ها بیشتر در محصولات گیاهی که زمان عمل‌آوری طولانی‌تری دارند یا دوره رسیدگی را پشت سر می‌گذارند استفاده می‌شود (۱).

مقادیر نیترات و نیتريت، شاخص‌های مهمی برای ارزیابی کیفیت آب می‌باشد. و از این رو آب منبع مهم نیتريت از طریق احیا نیترات محسوب می‌شود (۲). از آنجا که عمل‌آوری گوشت شامل استفاده از نمک، شکر، نیتريت و یا نیترات در گوشت برای پدید آمدن یکسری ویژگی‌های مطلوب در آن می‌باشد. از بین این ترکیبات، نیتريت و نیترات از نقش کلیدی‌تری برخوردارند و عمده ویژگی‌های مطلوب گوشت‌های عمل‌آوری شده به آن‌ها مربوط می‌شود (۱). نیتريت سدیم یک نمک نم‌گیر سفید رنگ جامد با فرمول شیمیایی  $\text{NaNO}_2$  می‌باشد. در دمای  $320^\circ\text{C}$  تجزیه می‌شود و در آب و آمونیاک به خوبی حل شده به طوری که قابلیت حل آن ۸۲ گرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر آب می‌باشد. در اتانول، آب، اتر و پیریدین نیز قابل حل می‌باشد. سرطان‌زایی و جهش‌زایی نیتروزآمین‌ها در بسیاری از حیوانات به اثبات رسیده است و از این رو در خصوص تولید این ماده در فرآورده‌های گوشتی عمل‌آوری شده نگرانی‌های زیادی وجود دارد (۳). هنگامی که pH معده اسیدی باشد و باکتری‌های روده‌ای در روده موجود باشند، نیتريت به آسانی با آمین‌های ثانویه و آمیدها واکنش می‌دهد و ترکیبات سرطان‌زای N-nitroso را تولید می‌کند (۲ و ۵).

به نظر می‌رسد که سطح نیتريت بدن پستانداران به صورت حفاظت شده می‌باشد. در انسان‌ها نیتريت پلاسما در محدوده ۱۲۱ تا ۳۵۰ نانومول قرار دارد و کاهش این میزان همراه با اختلال اندوتلیال و افزایش فاکتورهای خطرناک

بیماری‌های عروق کرونری بوده است (۶). مطالعات متعدد اثرات گشاد کنندگی عروق، توسط نیتريت در دوزهای پایین در موش‌های صحرایی، گوسفند، سگ، پریمات و انسان را تأیید کرده است. در حالتی که اکسیژن به میزان کافی باشد  $\text{NO}$ ،  $\text{NO}_2$  را از L- آرژینین تولید می‌کند. مقداری از این NO به ماهیچه‌های صاف رسیده و باعث اتساع عروق می‌شود. در حالی که مقداری از آن در خون به نیترات و در بافت به نیتريت تبدیل می‌شود (۵).

اثرات سمیت NO به طور مستقیم، نسبتاً زیاد نمی‌باشد. اما در اثر واکنش با سوپر اکسایدها و تشکیل پروکسی نیتريت، اثر سمیت آن به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد (۷) پروکسی نیتريت (-ONOO) می‌تواند به طور آزادانه از غشا دو لایه فسفو لیپیدی عبور کند و با مولکول‌های هدف زیادی از قبیل لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA واکنش داده و در نهایت مرگ سلولی از طریق نکروز و یا آپتوزیس را ایجاد کند (۸). در حقیقت میزان سمیت نیتريت نسبت به نیترات، تا ده برابر بیشتر می‌باشد و باعث مشکلاتی از قبیل مت هموگلوبینمیا، هیپرتروفی ناحیه زونا گلوبروزای آدرنال (در موش‌های صحرایی) و شواهد نامعلومی از سرطان‌زایی مانند سرطان کبد مثانه، ریه و مری می‌شوند (۳ و ۴). آلف (Alef) و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که رژیم غذایی حاوی نیتريت باعث تأثیر منفی بر مکانیسم پرمیتوسیس درون رگ‌ها می‌شود (۹).

همچنین بوربلی (Borbely) و همکاران در سال ۲۰۰۵ گزارش دادند که پروکسی نیتريت، مولکول‌های  $\alpha$ -اکتین‌های موجود در میوکاردیوم قلب را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۰). علی‌رغم اینکه نیتريت بر روی سیستم‌های مختلف بدن تأثیرگذار است، در صنایع غذایی، دارویی و شیمیایی مصرف گسترده‌ای داشته و همچنین امروزه در بسیاری از مواد غذایی و آفت کش‌ها به طور

موش‌ها به غذای فشرده استاندارد به صورت نامحدود دسترسی داشتند. موش‌های صحرایی در ۳ گروه ده تایی به شرح زیر طبقه‌بندی شدند:

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

۲- **گروه تیمار با دوز پایین:** روزانه مقدار ۱۷۵ میلی‌گرم به ازای یک کیلوگرم وزن بدن خود نیتريت سدیم به صورت محلول در آب آشامیدنی شهرستان کازرون به همراه رژیم غذایی سالم و طبیعی دریافت می‌کردند.

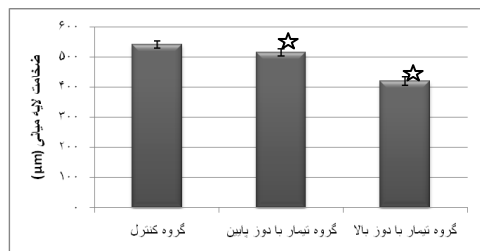
۳- **گروه تیمار با دوز بالا:** روزانه مقدار ۳۵۰ میلی‌گرم به ازای یک کیلوگرم وزن بدن خود نیتريت سدیم به صورت محلول در آب آشامیدنی شهرستان کازرون به همراه رژیم غذایی سالم و طبیعی دریافت می‌کردند (۲) پس از دوره ۶۰ روزه تیمار، در روز ۶۱ موش‌ها با استفاده از پنبه آغشته به اتر در جابجایی بی‌هوشی، بی‌هوش گردیدند. از حیوان بی‌هوش شده خونگیری به عمل آمد و سرخرگ آئورت را بیرون آورده و پس از شستشو با سرم فیزیولوژی، برای تهیه مقاطع بافتی در فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفتند رنگ‌آمیزی مقاطع بافتی به روش هماتوکسین-اِوزین و ماسون تری کروم انجام و تغییرات هیستوپاتولوژیکی بافت سرخرگ مورد بررسی قرار گرفت. جدا سازی سرم صورت گرفت و جهت اندازه‌گیری نیتريك اکساید به آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد واحد کازرون ارسال گردید. برای اندازه‌گیری غلظت نیتريك اکساید از کیت MDI 040 Colorimetric Nitric Oxide Assay Kit: Cod بر مبنای طیف سنجی استفاده شد

نحوه اندازه‌گیری ضخامت لایه مدیا در سرخرگ‌های مختلف ابتدا برنامه Image tool را بر روی کامپیوتر نصب شده و پس از اتصال میکروسکوپ و کامپیوتر به همدیگر؛ با

بی‌رویه مورد استفاده قرار گرفته است. آئورت و انشعاباتی که از کمان آئورت سرچشمه می‌گیرند از نوع سرخرگ‌های الاستیک می‌باشند دیواره این رگ‌ها ممکن است به دلیل فراوانی الاستیک در آن‌ها، زرد رنگ و تازه باشد. پوشش میانی سرخرگ‌های الاستیک دارای یک لایه اندوتلیوم است که به وسیله یک لایه باریک در بافت پیوندی زیرین حمایت می‌شود (۱۱). با توجه به خاصیت ارتجاعی دیواره سرخرگ الاستیک، در حالی که خون از قلب به طور متناوب پمپ می‌گردد، در سیستم سرخرگی به صورت پیوسته جریان می‌یابد (۱۰). از آنجا که ترکیبات حاوی نیترات به صورت گسترده به عنوان نگهدارنده در غذاهای آماده استفاده می‌شود، سرخرگ آئورت به عنوان یک هدف در اثرات جانبی مصرف ترکیبات حاوی نیترات مطرح می‌باشد. لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات هیستوپاتولوژیکی نیتريت سدیم و تأثیرات آن بر بافت سرخرگ آئورت می‌باشد. با نتایج حاصل از این پژوهش، می‌توان با آگاهی بیشتر افراد را متوجه خطرات احتمالی مصرف این ترکیبات نمود.

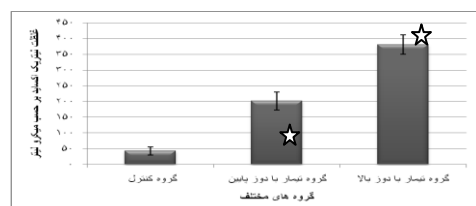
## مواد و روش‌ها

در این پژوهش از ۳۰ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار استفاده که تمامی این موش‌ها از خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی اهواز تهیه و در شرایط آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون نگهداری شدند. جهت مأنوس شدن حیوان با محیط جدید، موش‌ها به مدت سه روز قبل از شروع آزمایش در شرایط جدید نگهداری شدند. موش‌های صحرایی در قفس‌های پلی‌اتیلنی مخصوص و در شرایط استاندارد با درجه حرارت محیطی در زمان انجام آزمایش ۲۵-۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و شرایط نوری در چرخه‌ی زمانی ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی، به مدت ۶۳ روز (۶۰ روز برای آزمایش و ۳ روز برای سازگاری در محیط) نگهداری شدند. تمام



نمودار ۱) تغییرات کمی ضخامت لایه میانی دیواره سرخرگ آنورت در موش صحرایی نر در پایان آزمایش (روز شصتم). مقادیر بر اساس میانگین  $\pm$ خطای معیار میانگین ( $\bar{x} \pm SEM$ ) آورده شده‌اند.  $\star$  نشان دهنده اختلاف معنی‌داری در بین گروه‌های تجربی دریافت کننده نیتريت سدیم (گروه ۲ یا گروه تیمار با دوز پایین نیتريت سدیم و گروه ۳ یا گروه تیمار با دوز بالای نیتريت سدیم) در مقایسه با گروه کنترل (گروه ۱) در سطح  $p \leq 0.05$  می‌باشد.

**میزان نیتريك اكسايد:** نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بعد از دریافت نیتريت سدیم از طریق آب آشامیدنی با اندازه‌گیری میزان نیتريك اكسايد؛ میزان نیتريك اكسايد در دو گروه تیمار با دوز پایین و بالا نیتريت سدیم در مقایسه با گروه کنترل، به صورت معناداری در سطح  $p \leq 0.05$  افزایش یافته است میانگین غلظت نیتريك اكسايد در گروه کنترل  $42/12 \pm 13/14$  میکرومول بر لیتر و در گروه تیمار با دوز پایین (۱۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن/روز)،  $201/51 \pm 28/19$  میکرومول بر لیتر و در گروه دریافت کننده دوز بالا (۳۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن/روز)،  $380/62 \pm 30/52$  میکرومول بر لیتر می‌باشد، که در گروه تیمار با دوز بالای نیتريت سدیم در مقایسه با گروه کنترل در سطح  $p \leq 0.05$  کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد (نمودار ۲).



نمودار ۲) تغییرات کمی میزان نیتريك اكسايد در پایان آزمایش (روز شصتم). مقادیر بر اساس میانگین  $\pm$ خطای معیار میانگین ( $\bar{x} \pm SEM$ ) آورده شده‌اند. اختلاف معنی‌داری در بین گروه‌های تجربی دریافت نیتريت سدیم (گروه ۲ یا گروه تیمار با دوز پایین نیتريت سدیم و گروه ۳ یا گروه تیمار با دوز بالای نیتريت سدیم) در مقایسه با گروه کنترل (گروه ۱) در سطح  $p \leq 0.05$  وجود دارد.

استفاده از این برنامه ضخامت لایه مدیا اندازگیری شد. بدین صورت که لام مورد نظر را در زیر میکروسکوپ قرار داده و پس از تنظیم کردن میکروسکوپ، با استفاده از کامپیوتر عکسی از مقطع مورد نظر در سرخرگ‌ها با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ و ۴۰۰ گرفته می‌شد؛ و با استفاده از این نرم‌افزار ضخامت لایه مدیا حداقل در ۵ نقطه بر حسب میکرومتر اندازه‌گیری می‌شد و این کار برای تمام مقاطع بافتی صورت می‌گرفت؛ و داده‌های به دست آمده توسط برنامه SPSS (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) ویرایش ۱۷ و با استفاده از تست‌های آماری T-test و ANOVA مورد بررسی آماری قرار گرفتند.

## یافته‌ها

### نتایج کمی

**ضخامت لایه میانی:** لام سرخرگ‌های مورد مطالعه را پس از رنگ‌آمیزی در زیر میکروسکوپ قرار داده و پس از تنظیم کردن میکروسکوپ، با استفاده از کامپیوتر عکسی از مقطع مورد نظر در سرخرگ‌ها با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ و ۴۰۰ گرفته می‌شد؛ و با استفاده از این نرم‌افزار ضخامت لایه مدیا حداقل در ۵ نقطه بر حسب میکرومتر اندازه‌گیری می‌شد. نتایج حاصل از این اندازه‌گیری به این صورت بود که میانگین ضخامت لایه میانی در گروه کنترل  $541/42 \pm 10/45$  میکرومتر و در گروه تیمار با دوز پایین (۱۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن/روز)،  $514/17 \pm 11/75$  میکرومتر و در گروه تیمار با دوز بالا (۳۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن/روز)،  $419/69 \pm 13/31$  میکرومتر می‌باشد، که در گروه تیمار با دوز بالا در مقایسه با گروه کنترل در سطح  $p \leq 0.05$  کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد (نمودار ۱).

## نتایج کیفی

## نتایج مربوط به مطالعات هیستولوژی بافت سرخرگ‌های

## آئورت در زیر میکروسکوپ نوری

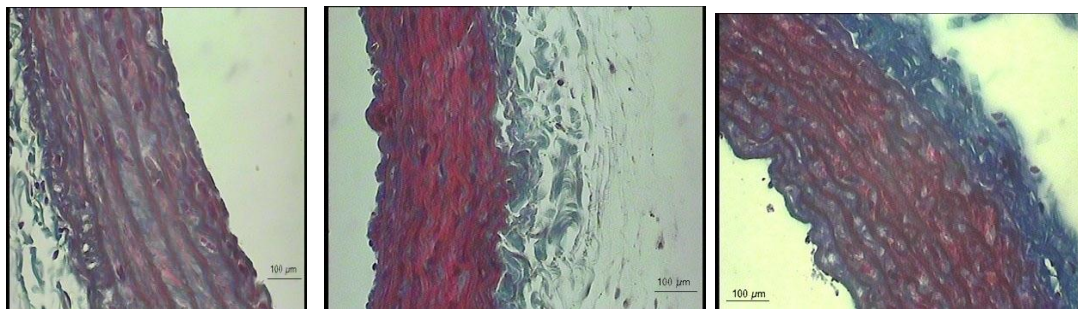
فتومیکروگراف نوری مقطعی از سرخرگ آئورت در گروه‌های کنترل، گروه تیمار با دوز پائین (۱۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن/ روز) و تیمار با دوز بالای نیتريت سدیم (۳۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن/ روز) در پایان آزمایش، روز شصتم را نشان می‌دهد.

همان‌گونه که در شکل ۱، ۲ و ۴ که مربوط به دو گروه دریافت کننده ۱۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیتريت سدیم و گروه کنترل است؛ ملاحظه می‌شود ظاهر تمام نواحی لایه مدیا کاملاً منظم، یکنواخت و ضخامت نرمال را داشته ولی در شکل ۳ و ۵ که مربوط به گروه دریافت کننده ۳۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیتريت سدیم می‌باشد ظاهر تمام

نواحی لایه مدیا نسبتاً نامنظم، غیریکنواخت بوده و مقادیر زیادی از تجمع لنفوسیت در لایه‌ی انتیما مشاهده می‌شود که نشان دهنده ارتشاح لنفاوی است (شکل ۵).

## مطالعات میکروسکوپ نوری بافت سرخرگ آئورت

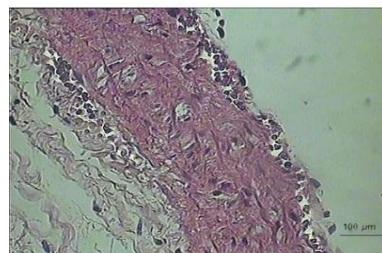
شکل ۱ و ۴ سرخرگ آئورت را در گروه کنترل به ترتیب با رنگ‌آمیزی ماسون تری کروم و هماتوکسیلین انوزین، شکل ۲ سرخرگ آئورت را در گروه تیمار با دوز پایین (۱۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) نیتريت سدیم با رنگ‌آمیزی ماسون تری و شکل ۳ و ۵ ضایعات ایجاد شده در سرخرگ آئورت را در گروه تیمار با دوز بالا (۳۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) نیتريت سدیم با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ به ترتیب با رنگ‌آمیزی ماسون تری کروم و هماتوکسیلین انوزین نشان می‌دهد.



(۳)

(۲)

(۱)



(۵)



(۴)

آشامیدنی غلظت نیتريك اكساید در سرم افزایش یافته است در حالی که در گروه‌های کنترل غلظت نیتريت در سطح نرمال می‌باشد به طوری که باعث ایجاد

## بحث

در مطالعه‌ی حاضر در گروه تجربی تیمار شده با نیتريت سدیم به دلیل مصرف نیتريت سدیم در آب

تغییرات معنی‌داری در میانگین غلظت پلاسمایی نیتریک اکساید در گروه‌های تیمار شده نسبت به گروه کنترل در پایان آزمایش شده است و میزان نیتریک اکساید در گروه‌های تیمار با دوز پائین و بالای نیتريت سدیم نسبت به گروه کنترل در پایان آزمایش نشان می‌داد ( $p \leq 0/05$ ). مطالعات دیگری نشان می‌دهد که تیمار با نیتريت سدیم باعث تغییری در میزان ضربان قلب در موش صحرایی نمی‌شود و حتی در طی دوران آزمایش تنظیم درجه حرارت بدن به خوبی صورت می‌گیرد (۱۴). همچنین در سال ۲۰۰۹، استوکز (Stokes) و همکاران نشان دادند که مصرف نیتريت با دوز پایین در آب آشامیدنی مانع از چسبندگی لوکوسیت‌ها، باعث مهاجرت آن‌ها و مانع از اختلالات سرخرگی می‌شود. که این در ارتباط با کاهش یافتن اندک میزان tetrahydroprotein و کم شدن پروتئین c-reactive می‌باشد. این داده‌ها خصوصیات جدید ضد التهابی نیتريت را نشان داد ضمناً، نیتريت می‌تواند به عنوان درمان طبیعی برای التهاب میکرو و سکولارها و اختلالات اندوتلیالی وابسته به افزایش کلسترول خون معرفی گردد (۱۲).

همچنین کارل استروم (Carlestrom) و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که نیتريت موجود در رژیم غذایی می‌تواند مسیر نیتريت - نیتريت-NO را تحریک کند و تا حدی اختلال تولید NO از مسیر Enos داخلی را جبران کند که این روند می‌تواند باعث به وجود آمدن روشی برای تغذیه جدید در درمان یا پیشگیری علیه بیماری قلبی - عروقی یا دیابت نوع دو باشد (۱۵). اما از طرف دیگر NO در دوزهای بالا از طریق ایجاد اختلالات مختلف باعث انحطاط و از بین رفتن سلول‌ها (خصوصاً در سیستم عصبی) می‌شود NO خود نیز می‌تواند اثرات مضر را ایجاد کند (۱۷).

تغییرات معنی‌داری در میانگین غلظت پلاسمایی نیتریک اکساید در گروه‌های تیمار شده نسبت به گروه کنترل در پایان آزمایش شده است و میزان نیتریک اکساید در گروه‌های تیمار با دوز پائین و بالای نیتريت سدیم نسبت به گروه کنترل خود به طور معناداری افزایش یافته است ( $p \leq 0/05$ ) از آنجا که سرعت جذب نیتريت و نیتريت توسط دستگاه گوارش، در گونه‌های مختلف جانوران، متفاوت می‌باشد. سرعت جذب در دستگاه گوارش انسان‌ها و موش‌های صحرایی نسبتاً زیاد اما در نشخوارکنندگان سرعت جذب کمتر می‌باشد. نیتريت‌ها و نیتريت‌ها در اکثر گونه‌ها از قسمت بالایی روده - شکمبه به خوبی جذب می‌شود و بعد از مصرف یک وعده غذایی سرشار از نیتريت سطح این ماده در پلاسما افزایش یافته و تا مدت طولانی در آن حد باقی می‌ماند (نیمه عمر پلاسمایی نیتريت ۵-۶ ساعت می‌باشد). علاوه بر این میزان نیتريت پلاسما نیز پس از مصرف نیتريت افزایش می‌یابد (۲ و ۵).

در سال ۲۰۰۸، آلوسیک (Alusik) و همکاران به بررسی میزان نیتريت و نیتريت خون افراد جوان و مسن پرداختند و سطح نیتريت و نیتريت را با شاخص‌های التهابی مرتبط نشان دادند (۱۳). همچنین طبق مطالعات قبلی مصرف نیتريت سدیم به صورت محلول در آب آشامیدنی میزان نیتريت و نیتريت در پلاسما، بافت قلب و کبد را افزایش می‌دهد (۱۲).

در مطالعه حاضر نیز میزان نیتریک اکساید در گروه‌های دریافت کننده به طور معنی‌داری افزایش یافته که ناشی از دریافت این ماده از طریق آب آشامیدنی می‌باشد.

اندازگیری ضخامت لایه مدیا (IMT) روش استاندارد برای تشخیص عوامل خطر سیستم قلبی عروقی

گروه تیمار با دوز پایین نیتريت سدیم و گروه کنترل می‌باشد. بدین صورت که در گروه تیمار با دوز بالای نیتريت سدیم لایه مدیا نسبتاً نامنظم و حالت غیریکنواخت را نشان می‌دهد و مقادیری از تجمع لنفوسیت در این لایه به وفور یافت می‌شود.

دلیل اصلی آسیب لایه اندوتلیال و ماهیچه‌های صاف عروق، را می‌توان به تولید زیاد پروکسی نیتريت (ONOO) در دیواره عروق نسبت داد (۲۱).

مانین (Maneen) در سال ۲۰۰۶ در مطالعات خود بر روی موش صحرایی نشان داد که پروکسی نیتريت بر روی بافت عضلانی صاف سرخرگ‌های مغزی از طریق دپلمرازسیون f-اکتین تأثیر می‌گذارد. (۱۱). همچنین قرار گرفتن در معرض سوپر اکسید، پر اکسید هیدروژن، نیتريك اکساید و پروکسی نیتريت نیز به DNA سلول آسیب وارد می‌کند. پروکسی نیتريت در دوزهای مختلف مانع از سنتز پروتئین میتوکندریایی شده در نتیجه سطح ATP و عملکرد اکسیداسیون و احیای میتوکندریایی سلول را کاهش می‌دهد (۲۰).

همچنین زوی (Zou) در سال ۲۰۰۴ در طی تحقیقات خود نشان داده است که تشکیل ONOO در بیماری دیابت ملیتوس باعث شروع و پیشرفت مشکلات عروقی می‌شود و آسیب‌هایی از قبیل اتصال پلاکت‌ها و منوسیت‌ها، ترومبوسیت و آسیب‌های بافتی را به وجود می‌آورند (۲۱). به طور کلی بر اساس مطالعات انجام شده نیتريك اکساید و پروکسی نیتريت به وسیله مکانیسم‌های مختلف بر روی سیستم قلبی و عروقی تأثیر می‌گذارد و باعث ایجاد و راه‌اندازی پروسه‌ی مرگ سلولی می‌شود و آسیب‌هایی از قبیل اتصال پلاکت‌ها و منوسیت‌ها، ترومبوسیت و آسیب‌های بافتی را به وجود آورده و باعث اتساع عروق می‌شود. از آنجا که در این مطالعه میزان نیتريك اکساید خون

اونو (Ono) و همکاران در سال ۲۰۰۸ گزارش دادند که با استفاده از داروی Candesartan ضخامت لایه میانی سرخرگ کاروتید کاهش می‌یابد و علت این کاهش را، افزایش میزان NO در بدن توصیف کردند. همچنین در بعضی از شرایط پاتولوژیکی NO و  $O_2^-$  به طور همزمان ساخته می‌شود و زمانی که NO و  $O_2^-$  به طور خود به خود در کنار همدیگر قرار بگیرند، تولید پروکسی نیتريت افزایش می‌یابد (۱۹). پروکسی نیتريت به طور نسبتاً آهسته با بیشتر مولکول‌های بیولوژیک واکنش داده و به عنوان یک اکسیدکننده انتخابی شناخته شده می‌باشد (۷).

سمیت پروکسی نیتريت از طریق پراکسیداسیون لیپیدها، نیتروژن‌دار کردن پروتئین‌ها و اکسیداسیون آن‌ها، آسیب از طریق اکسیداتیو DNA، فعال کردن متالو پروتئین‌های ماتریکس و غیرفعال شدن یکسری از آنزیم‌ها به وجود می‌آید. همچنین پروکسی نیتريت در نتیجه آسیب‌های میتوکندریایی، آسیب‌های DNA، فعال‌سازی کاسپازها، اختلال در انتقال سیگنال‌ها، تنظیم نبودن میزان  $Ca^{2+}$  سبب مرگ سلولی در کاردیو میوسیت‌ها، و سلول‌های اندو تلیال و عضلات صاف عروق می‌شود (۱۸).

همچنین القا مرگ سلولی در لایه میانی و میتوکندری‌ها توسط نیتريك اکساید و پروکسی نیتريت نیز می‌تواند از عوامل کاهش ضخامت لایه میانی محسوب شود (۸). اما از آنجا که در این مطالعه نیتريت با دوز بالا مورد استفاده بود و میزان NO خون به طور معنی‌دار افزایش یافته است که این افزایش غلظت NO می‌تواند کاهش ضخامت لایه میانی را القا و تأیید کند (۱۹). مطالعات میکروسکوپی بر روی سرخرگ آئورت در گروه تیمار با دوز بالای نیتريت سدیم (۳۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن/روز) حاکی از تغییرات لایه مدیا نسبت به

نسبت داد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که مصرف نیتريت در دوزهای بالا یک فاکتور مضر برای بدن بوده و با کاهش میزان آن و یا جایگزینی این ماده با مواد دیگر می‌توان از اثرات مضر این ماده پرهیز کرد.

در گروه‌های تیمار با دوز پائین و بالای نیتريت سدیم افزایش یافته بود. این حالت غیر یکنواخت لایه مدیا در گروه تیمار با دوز بالای نیتريت سدیم (۳۵۰ میلی‌گرم برکیلوگرم) می‌تواند ناشی از تأثیر نیتريك اکساید و پروکسی نیتريت بر سیستم قلبی و عروقی

## References:

1. Forest J, Aberle E, Hedrick H, et al. Principle of Meat Science. 5<sup>th</sup> ed. English: Kendall Hunt Publishing, 2012, 30-5.
2. Alexander J, Benford D, Cockburn A, et al. Scientific Opinion Nitrite as undesirable substances in animal feed. EFSAJ 2009; 1017: 1-47.
3. Ismail AM, Mostafa AM, Abd El-Rahman. Microscopic Studies of The effect of some food additives on the kidney of albino rat. Egyptian J Hospital Med 2003; 12: 12-27.
4. Nasehinia HR, Mehdinia SM, Ghorbani R, et al. Nitrite concentration in distributed sausage in Semnan Province. Payesh Health Manitor 2008; 7: 3. (Persian)
5. Lundberg JO, Weitzber E, Gladwin MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. Nat Rev Drug Discov 2008; 7: 156-67.
6. Dezfulian C, Raat N, Shiva S, et al. Role of the anion nitrite in ischemia-reperfusion cytoprotection and therapeutics. Cardiovasc Res 2007; 75: 327-38.
7. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. Am J Physiol 1996; 271: C1424-37.
8. Li J, Li W, Su J, et al. Peroxynitrite induces apoptosis in rat aortic smooth muscle cells: possible relation to vascular diseases. Exp Biol Med (Maywood) 2004; 229: 264-9.
9. Alef MJ, Carchman E, Gladwin MT, et al. Dietary nitrates and nitrites modulate vascular intimal hyperplasia. J Ame College Surg 2010; 211: 138-9.
10. Borbély A, Tóth A, Édes I, et al. Peroxynitrite-induced alpha-actinin nitration and contractile alterations in isolated human myocardial cells. Cardiovasc Res 2005; 67: 225-33.
11. Maneen MJ, Hannah R, Vitullo L, et al. Peroxynitrite diminishes myogenic activity and is associated with decreased vascular smooth muscle F-Actin in rat posterior cerebral arteries. Stroke 2006; 37: 894-9.
12. Stokes KY, Dugas TR, Tang Y, et al. Dietary nitrite prevents hypercholesterolemic microvascular inflammation and reverses endothelial dysfunction. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2009; 296: H1281-8.
13. Alusik S, Jedlickova V, Paluch Z, et al. Plasma levels of nitrite/nitrate and inflammation markers in elderly individuals. Bratisl lek Listy 2008; 109: 289-92.
14. Helal E, Zahkak S, Soliman GZA, et al. Biochemical studies on the effect of sodium nitrite and/or glutathione treatment on male rats. Eryp J Hospital Med 2008; 30: 25-38.
15. Carlström M, Persson AEG, Larsson E, et al. Dietary nitrate attenuates oxidative stress, prevents cardiac and renal injuries, and reduces blood pressure in salt-induced hypertension. Cardiovasc Res 2011; 89: 574-85.
16. Litwin M, Niemirska A. Intima-media thickness measurements in children with cardiovascular risk factors. Pediat Nephrol 2009; 24: 707-19.
17. Meij JT, Haselton CL, Hillman KL, et al. Differential mechanisms of nitric oxide- and peroxynitrite-induced cell death. Mol Pharmacol 2004; 66: 1043-53.
18. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. Physiol Rev 2007; 87: 315-424.
19. Ono H, Minatoguchi S, Watanabe K, et al. Candesartan decreases carotid intima-media thickness by enhancing nitric oxide and decreasing oxidative stress in patients with hypertension. Hyperten Res 2008; 31: 271-9.
20. Ballinger SW, Patterson C, Yan CN, et al. Hydrogen peroxide- and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. Circ Res 2000; 86: 960-6.
21. Zou MH, Cohen RA, Ullrich V. Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus. Endothelium 2004; 11: 89-97.



Original Article

# Survey the effects of dietary sodium nitrite on the histological changes of the aortic artery in the adult male rats

*S. Khatamsaz*<sup>1\*</sup>, *F. Juibar*<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Department of Biology, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran*

<sup>2</sup> *Young Researchers and Elite Club, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran*

(Received 21 Nov, 2014      Accepted 17 May, 2015)

### *Abstract*

**Background:** Because of high consumption of nitrite in processed (fast) foods and high level of nitrite in water, soil and ecosystem, nitrite can endanger humans health. In this study the effects of sodium nitrite on aorta was examined in adult male rats.

**Materials and Methods:** In the present study, 30 Wistar adult male rats were randomly divided into three groups of 10, including; control group. First experimental group that received low dose of sodium nitrite (175 mg/kg.bw), second experimental group that received high dose of sodium nitrite (350 mg/kg.bw). They were examined for 60 days. The rats got sodium nitrite through drinking water. At the end of the experiment the rats were taken to the anesthesia jar and based on ether principles, they anesthetized with ether and their blood samples were collected from their hearts. Then their aorta were extracted from their bodies and the tissue sections were prepared for testing tissue changes. Features such as histological features of aorta (morphometric and morphologic features) were analyzed. The samples were stained with masson trichrome and Hematoxylin- Eosin methods. The internal media layer was measured with Image tool software. Then the amount of nitrite oxide in their blood were tested. At the end results were analyzed by 17 version of SPSS software and ANOVA test was run.

**Results:** The results of this study showed that thickness of medial layer in two experimental group that received low and high dose of sodium nitrite compared with the control group decreased ( $p < 0.05$ ), and the group that received of high dose of sodium nitrite showed irregular and non- uniform state in aortic media layer.

**Conclusion:** The finding of this study indicated that consumption of sodium nitrite in long term can induce damage in arteries tissue.

**Key words:** sodium nitrite, aorta artery, rats, nitric oxide

\*Address for correspondence: Department of Biology, Faculty of Sciences, Islamic azad university Kazeroon branch, Kazeroon, Iran, Email: [saeed1617@yahoo.com](mailto:saeed1617@yahoo.com)