



## بررسی اثر نیتريت سدیم بر میزان نیتريك اكساید خون و تغییرات هیستوپاتولوژیکی سرخرگ ششی در موش صحرائی نربالغ

فاطمه جویبار<sup>۱</sup>، سعید خاتم ساز<sup>۲</sup>، علی قربانی رنجبری<sup>۳\*</sup>

۱- کارشناسی ارشد زیست شناسی علوم جانوری - فیزیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، کازرون، ایران

۲- دکتری زیست شناسی جانوری - فیزیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، کازرون، ایران

۳- دکترای دامپزشکی، باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، کازرون، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۷/۱۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۵

### چکیده

مقدمه: ترکیبات نیتريت از جمله افزودنی‌هایی هستند که در فرآورده‌های گوشتی مورد استفاده قرار می‌گیرند، همچنین امروزه به دلیل استفاده بی رویه کودهای نیتروژن دار این ماده به صورت گسترده در آب خاک و اکوسیستم‌ها وجود دارد و می‌تواند زندگی بسیاری از انسانها را در معرض خطر قرار دهد، لذا مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر نیتريت سدیم بر سرخرگ ششی در موش‌های صحرائی نر صورت پذیرفت.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی- مقطعی ۳۰ سر موش صحرائی نر بالغ نژاد ویستار به طور تصادفی به سه گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند، سپس به مدت ۶۰ روز مورد مداخله قرار گرفتند. گروه‌های مورد آزمایش به گروه‌های دریافت‌کننده دوز حداقل نیتريت سدیم (۱۷۵mg/kg/day) و گروه دریافت‌کننده دوز حداکثر (۳۵۰mg/kg/day) و گروه کنترل تقسیم شدند. در پایان روز ۶۰ پس از بیهوشی و خونگیری مستقیم از قلب، سرخرگ ششی از بدن حیوان خارج، و سپس جهت بررسی تغییرات بافتی از آنها مقاطع بافتی تهیه شد. عواملی نظیر ویژگی‌های بافت شناسی (مورفومتریک و مورفولوژیک) سرخرگ، تغییرات وزن بدن در قبل و بعد از آزمایش و میزان نیتريك اكساید خون مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های به دست آمده توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج: نتایج مطالعه حاضر نشان داد میزان نیتريك اكساید در خون حیوانات گروه‌های دریافت‌کننده نیتريت سدیم در مقایسه با گروه کنترل، به صورت معنی‌داری افزایش یافته است ( $p \leq 0/05$ ). همچنین ضخامت لایه میانی در گروه دریافت‌کننده دوز ۳۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم نیتريت سدیم در سطح معنی‌داری نسبت به گروه کنترل خود کاهش یافته است ( $p \leq 0/05$ ).

نتیجه‌گیری: براساس نتایج حاصل، نیتريت سدیم در دوزهای مختلف توانست میزان نیتريك اكساید خون را افزایش دهد و در دوز ۳۵۰ میلی‌گرم نیتريت سدیم باعث کاهش ضخامت لایه میانی سرخرگ ششی گردید. بنابراین نیتريت یک عامل خطر در انسان می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: نیتريت سدیم، سرخرگ ششی، لایه میانی، نیتريك اكساید، موش صحرائی

## مقدمه

امروزه استفاده از افزودنی‌ها در مواد غذایی مصنوعی به طور گسترده افزایش یافته است و انسان‌ها به طور گسترده در معرض نگهدارنده‌ها قرار گرفته‌اند (۱). همچنین به دلیل ارتقاء کیفیت و محافظت از آلودگی‌های میکروبی از نیترات و نیتريت به طور گسترده در محصولات گوشتی فرآوری شده استفاده می‌شود (۲). در بسیاری از مواقع نیز به دلیل نبودن زمین‌های حاصلخیز 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 (۳). در گذشته یون نیتريت را از لحاظ فیزیولوژیکی خنثی و بدون اثر و فقط به عنوان محصول نهایی و پایانی نیتريك اكساید به حساب می‌آوردند اما امروزه با افزایش شواهد نشان داده شده است که نیتريت در مرکز پیچیده حساس هیپوکسی و انتقال پیام شیمیایی قرار دارد. نیتريت در مرکز واکنش‌های اکسیداسیون و احیا قرار گرفته است و می‌تواند به رادیکال بسیار فعال و بیولوژیکی نیتريك اكساید احیا یا به طور فراوان به آنیون نیترات اكسید تبدیل شود (۴). مقادیر نیترات و نیتريت، شاخص‌های مهمی برای ارزیابی کیفیت آب می‌باشد و از اینرو آب می‌تواند منبع مهم نیتريت از طریق احیا نیترات محسوب شود (۵). سرعت جذب نیترات و نیتريت توسط دستگاه گوارش، در گونه‌های مختلف جانوران، متفاوت می‌باشد. به طوری که سرعت جذب در دستگاه گوارش انسان‌ها و رت‌ها نسبتاً زیاد اما در نشخوارکنندگان سرعت جذب کمتر می‌باشد. نیترات‌ها و نیتريت‌ها در اکثر گونه‌ها از قسمت بالایی روده - شکمبه به خوبی جذب می‌شود و بعد از مصرف یک وعده غذایی سرشار از نیترات سطح این ماده در پلاسما افزایش یافته و تا مدت طولانی در آن حد باقی می‌ماند (نیمه عمر پلاسمایی نیترات ۵-۶ ساعت می‌باشد) علاوه بر این میزان نیتريت پلاسما نیز پس از مصرف نیترات افزایش می‌یابد (۵،۶). در حقیقت میزان سمیت نیتريت نسبت به نیترات، تا ده برابر بیشتر می‌باشد و باعث مشکلاتی از قبیل متهموگلوبین هیپرتروفی ناحیه زونا

گلوکزهای آدرنال (در موش‌های صحرایی) و شواهد نامعلومی از سرطان‌زایی مانند سرطان کبد مثانه، ریه و مری می‌شوند (۳،۲). هنگامی که Ph معده، اسیدی باشد و باکتری‌های روده ایی در روده موجود باشند، نیتريت به آسانی با آمین‌های ثانویه و آمیدها واکنش می‌دهد و ترکیبات سرطان‌زای N-nitrose را تولید می‌کند، سرعت تشکیل نیتروزاسیون با آمین‌های ثانویه متناسب با مجذور غلظت نیتريت می‌باشد (۵). مطالعاتی که توسط Chan و همکاران به بررسی اثر نیتريت سدیم به مدت ۱۴ هفته بر روی موش‌های صحرایی پرداختند، به این نتیجه دست یافتند که نیتريت سدیم باعث تخریب بافت بیضه و کاهش حرکت اسپرم‌ها می‌شود و در ماده‌ها نیز طول سیکل جنسی افزایش می‌یابد (۷). همچنین Kenyatta Cosby و همکاران نیز نشان دادند که نیتريت همانند یک مخزن بیولوژیکی برای NO عمل می‌کند و هموگلوبین همانند نیتريت ردوکتاز، پتانسیل اتساع عروق را در زمان کاهش اکسیژن دارد.

Alef و همکاران نیز گزارش دادند که رژیم غذایی حاوی نیتريت می‌تواند بر تعدیل پر سلولی شدن غشا درونی رگ‌ها تأثیر بگذارد و Borbely و همکاران بیان کردند که پروکسی نیتريت،  $\alpha$ -اکتین‌های موجود در میوکاردیوم قلب را مورد هدف قرار می‌دهد و نیتروژن‌دار شدن  $\alpha$ -اکتین باعث اختلال در انقباض قلب می‌شود و این اختلال احتمالاً از طریق کاهش اتصال نیروی طولی میان سارکومرهای مجاور ایجاد می‌شود (۸،۹). علی‌رغم اینکه این ماده بر روی سیستم قلبی و عروقی تأثیرگذار است (۱۰) و در صنایع غذایی، دارویی و شیمیایی مصرف گسترده‌ای دارد و در جوامع امروزی نیز در فست فودها و آفت کش‌ها به طور بی‌رویه مورد استفاده قرار گرفته است، اما تاکنون مطالعه‌ای در زمینه بررسی اثرات هیستوپاتولوژیکی بر بافت سرخرگ ششی صورت نگرفته است، لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات هیستوپاتولوژیکی نیتريت سدیم و تأثیرات آن بر سرخرگ ششی می‌باشد و از آنجا که اندازه‌گیری لایه مدیا (IMT) روش استاندارد تشخیص

دور در دقیقه سانترفیوژ شدند و از محلول فوقانی جهت اندازه‌گیری نیتریک اکساید استفاده شد (۱۲).

سپس ۵۰ میکرولیتر سولفانامید (۰/۱) گرم در ۵ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک (۰/۵) و متعاقب آن ۵۰ میکرولیتر NEDD, N-(1-Naphtyl) ethylenediamine (۰/۰۰۵) گرم در ۵ میلی‌لیتر آب مقطر) افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از انجام واکنش گریس و تشکیل جذب رنگ، جذب نوری حاصل از تشکیل ماده رنگی در ۵۴۰nm توسط دستگاه خوانش‌گر الیزا خوانده و با استفاده از منحنی استاندارد غلظت نمونه‌ها محاسبه شد.

جهت اندازه‌گیری ضخامت لایه مدیا در سرخرگ‌های مختلف، ابتدا برنامه Image tool را بر روی کامپیوتر نصب کرده و پس از اتصال میکروسکوپ و کامپیوتر به همدیگر و با استفاده از این برنامه ضخامت لایه مدیا اندازه‌گیری شد. بدین صورت که لام مورد نظر در زیر میکروسکوپ قرار داده و پس از تنظیم کردن میکروسکوپ، توسط نرم افزار مذکور و با استفاده از کامپیوتر از مقطع مورد نظر با بزرگنمایی ۱۰۰ و ۴۰۰، عکس گرفته شد و با استفاده از این نرم‌افزار ضخامت لایه مدیا حداقل در ۵ نقطه بر حسب میکرومتر محسوب می‌شد و این کار برای تمام مقاطع بافتی صورت گرفت.

داده‌های به دست آمده توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ تجزیه و تحلیل شد و با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه برای مقایسه میزان نیتریک اکساید و ضخامت لایه مدیا در میان گروه‌های مختلف استفاده شد. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

### نتایج

در تمام گروه‌ها وزن موش‌های صحرایی بعد از اتمام دوره آزمایش نسبت به قبل افزایش وزن را نشان دادند که این افزایش وزن فقط در گروه کنترل معنی‌دار بود ( $p \leq 0/05$ ). اما در پایان آزمایش، میانگین وزن کلیه گروه‌ها با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌داد (جدول ۱).

عوامل خطر سیستم قلبی عروقی محسوب می‌شود (۱۱). ضخامت لایه مدیا نیز به دلیل بررسی بیشتر اندازه‌گیری شد.

### روش بررسی

در این پژوهش از ۳۰ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار با وزن تقریبی  $240 \pm 10$  گرم و سن حدود ۳-۴ ماه استفاده و از خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی اهواز تهیه و در شرایط آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی کازرون نگهداری شدند.

موش‌های صحرایی به ۳ گروه ده تایی 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 حداقل: 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 حداکثر: 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.

پس از دوره ۶۰ روزه تیمار، در روز ۶۱ موش‌ها توسط مهارکننده و دستگاه مقیدکننده توزین شدند و بعد با استفاده از پنبه آغشته به اتر در جار بیهوشی، بیهوش گردیدند. از حیوان بیهوش شده خونگیری به عمل آمد و سرخرگ ششی را بیرون آورده و پس از شستشو با سرم فیزیولوژی، برای تهیه مقاطع بافتی در فرمالین ۱۰٪ قرار گرفتند. رنگ آمیزی نمونه‌ها به روش هماتوکسیلین ائوزین صورت گرفت. جداسازی سرم انجام و سرم‌ها در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد فریز شدند. اندازه‌گیری میزان نیتریک اکساید خون سرم طبق واکنش گریس در میکروپلیت الیزا انجام شد. برای پروتئین زدایی ۴۰۰ میکرولیتر نمونه با ۶ میلی‌گرم پودر سولفات روی مخلوط گردید و پس از مخلوط شدن به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰

جدول ۱: مقادیر میانگین وزن موش‌های صحرایی در گروه‌های تجربی و کنترل در ابتدا و انتهای آزمایش

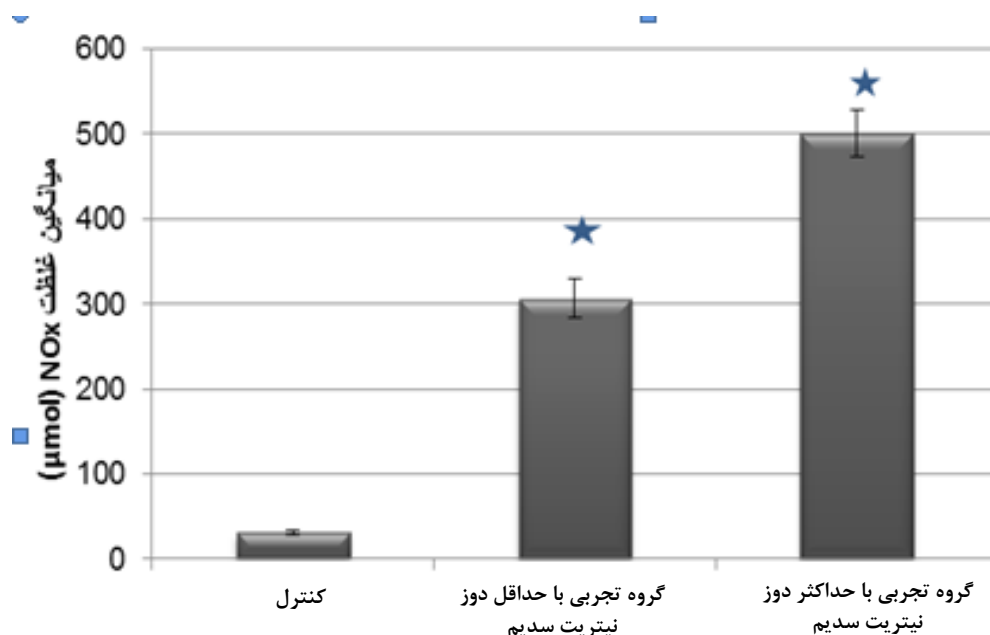
گروه‌های مختلف	وزن بدن قبل از آزمایش (گرم) (میانگین ± انحراف معیار)	وزن بدن بعد از آزمایش (گرم) (میانگین ± انحراف معیار)
کنترل	۵/۶ ± ۲۴۱/۱	۱۴/۰۴ ± ۲۹۰/۸*
گروه تجربی با دوز حداقل نیتريت سدیم	۲۴۷/۵ ± ۸/۹	۲۷۳/۵۵ ± ۱۱/۹۶
گروه تجربی با دوز حداکثر نیتريت سدیم	۳ ± ۲۴۷/۱	۱۰/۵۴ ± ۲۶۸/۷

\* اختلاف معنی‌داری در میانگین وزن گروه کنترل، در قبل و بعد از آزمایش در سطح  $p \leq 0.05$  وجود دارد.

در گروه حداکثر و حداقل نسبت به گروه کنترل خود در سطح افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد ( $p \leq 0.05$ ) (نمودار ۱).

اختلاف معنی‌داری در بین گروه‌های تجربی دریافت نیتريت سدیم در مقایسه با گروه کنترل در سطح وجود دارد ( $p \leq 0.05$ ).

میزان میانگین نیتريك اكساید در گروه تیمار با دوز ۱۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم  $306/62 \pm 23/13$  میکرومول و میزان میانگین نیتريك اكساید در گروه تیمار با ۳۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم  $501/52 \pm 27/74$  میکرومول و میانگین غلظت پلاسمایی طبیعی نیتريك اكساید در گروه کنترل  $31/35 \pm 3/07$  میکرومول بود که میزان نیتريك اكساید



نمودار ۱: میانگین غلظت نیتريك اكساید خون در گروه‌های تجربی با حداقل و حداکثر دوز با گروه کنترل در موش صحرایی نر

کاهش معنی‌داری مشاهده شد ( $p \leq 0.05$ ).

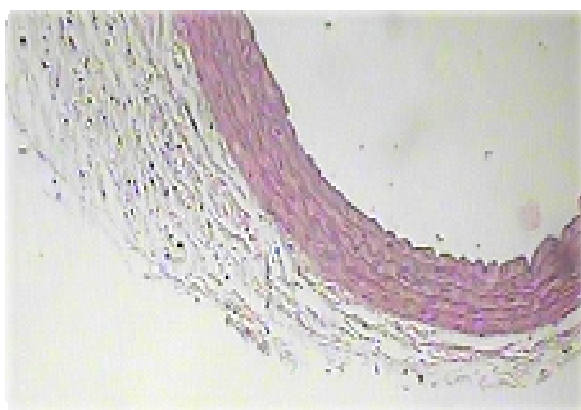
تصویر ۴-۱ فتومیکروگراف نوری مقطعی از شریان ششی در گروه‌های کنترل، دریافت‌کننده حداقل دوز تجربی و گروه دریافت‌کننده حداکثر دوز در پایان آزمایش را نشان می‌دهد

میانگین ضخامت لایه میانی در گروه کنترل  $316/70 \pm 1/21$  میکرو متر و در گروه دریافت‌کننده دوز حداقل  $320/13 \pm 1/04$  میکرو متر و در گروه دریافت‌کننده دوز حداکثر  $245/12 \pm 1/10$  میکرو متر بود، که در گروه حداکثر در مقایسه با گروه کنترل

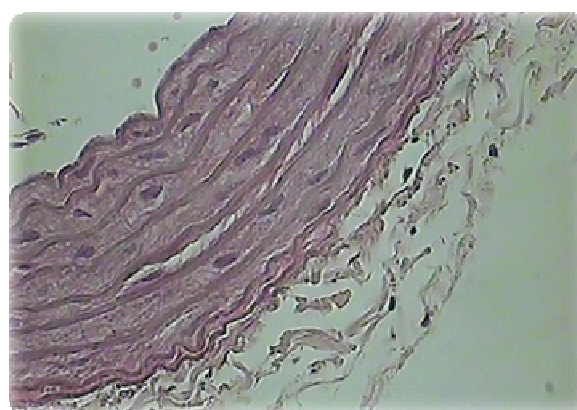
انتیما که نشان‌دهنده ارتشاح لنفاوی است نیز مشاهده گردید.

به طور کلی مطالعات میکروسکوپی بر روی سرخرگ ششی در گروه دریافت‌کننده دوز حداکثر، حاکی از تغییرات لایه مدیا نسبت به گروه حداقل و کنترل می‌باشد. بدین صورت که در گروه دریافت‌کننده ۳۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم لایه مدیا نسبتاً نامنظم و حالت غیر یکنواخت را نشان می‌دهد و مناطقی با تجمع قابل توجه لنفوسیت نیز، در لایه مدیا قابل مشاهده می‌باشد. در صورتی که این ناهنجاری‌ها در گروه دریافت‌کننده ۱۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به طور واضح دیده نشده است.

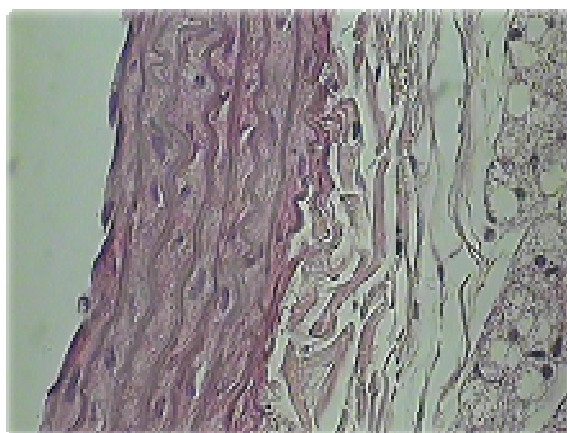
همانگونه که در تصاویر ۱ و ۲ ملاحظه می‌شود در گروه کنترل، ظاهر تمام لایه‌ها کاملاً منظم، یکنواخت و ضخامت نرمال برابر  $347/41 \pm 2/53$  ( $\mu\text{m}$ ) را داشته و در تصاویر ۳ و ۴ که مربوط به گروه دریافت‌کننده دوز ۱۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌باشد تمام لایه‌ها کاملاً منظم، یکنواخت و ضخامت نرمال برابر  $340/38 \pm 4/10$  ( $\mu\text{m}$ ) داشته و تغییرات هیستوپاتولوژیکی خاصی دیده نمی‌شود. اما در تصاویر ۵ و ۶ که متعلق به گروه دریافت‌کننده ۳۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌باشد ظاهر تمام لایه‌ها نسبتاً نامنظم، غیریکنواخت و ضخامت لایه مدیا برابر  $277/70 \pm 1/81$  ( $\mu\text{m}$ ) را نشان می‌دهد و مقادیری از تجمع لنفوسیت در لایه



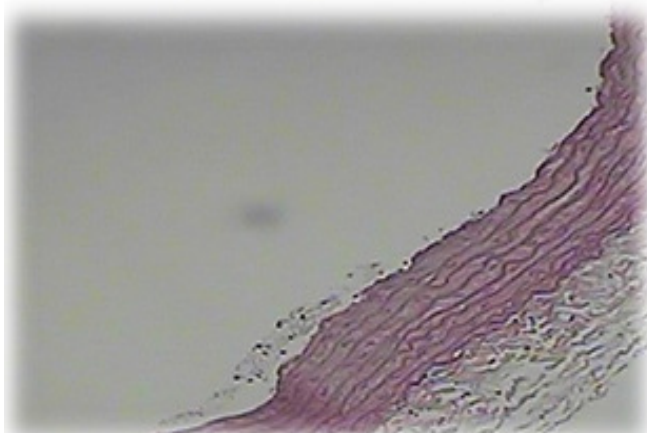
تصویر ۲: سرخرگ ششی در گروه کنترل  $\times 100$



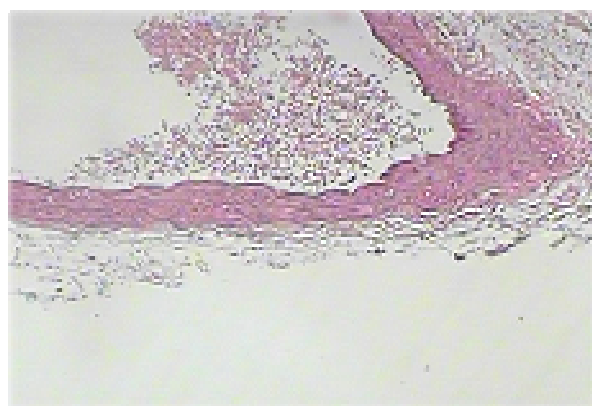
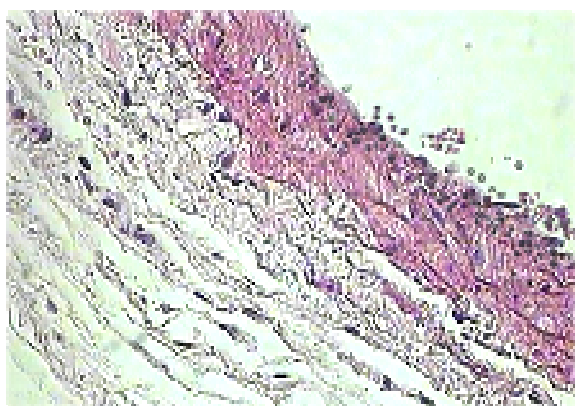
تصویر ۱: سرخرگ ششی در گروه کنترل  $\times 400$



تصویر ۴: سرخرگ ششی در گروه دریافت‌کننده دوز ۱۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم  $\times 400$



تصویر ۳: سرخرگ ششی در گروه دریافت‌کننده دوز ۱۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم  $\times 100$



تصویر ۵: سرخرگ ششی در گروه دریافت کننده دوز ۳۵۰ میلیگرم بر کیلوگرم × ۱۰۰ تصویر ۶: سرخرگ ششی در گروه دریافت کننده دوز ۳۵۰ میلیگرم بر کیلوگرم × ۴۰۰

### بحث

بدن و یا تأثیر نیتريت سدیم بر کاهش لیپید کلی سرم و پروتئین‌های کلی سرم و سطح آلبومین باشد (۱۵-۱۳). میانگین غلظت پلاسمایی NOx در گروه‌های دریافت کننده مقادیر مختلف نیتريت سدیم دارای اختلاف معنی داری با گروه کنترل می‌باشد. همچنین در مطالعه‌ای که توسط Stokes و همکاران انجام گرفت، گزارش داده شد که مصرف نیتريت سدیم به صورت محلول در آب آشامیدنی، میزان نیتريت و نترات در پلاسما، بافت قلب و کبد را افزایش می‌دهد (۱۶). در مطالعه حاضر نیز به دلیل مصرف نیتريت سدیم میزان نیتريك اكساید خون موش‌های صحرایی افزایش یافت. دریافت نیتريت سدیم از طریق آب شرب با مقادیر حداقل و حداکثر، باعث ایجاد تغییرات معنی داری در میانگین ضخامت لایه مدیا حیوانات در گروه‌های تیمار شده نسبت به گروه کنترل در پایان آزمایش شده است. Ono و همکاران گزارش دادند 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 و در مطالعه حاضر نیز، میزان NO خون به طور معنی دار افزایش یافته است و بر اساس داده‌های Ono این افزایش غلظت NO می‌تواند کاهش ضخامت لایه میانی را القا کند (۱۷) و همچنین القا مرگ سلولی در لایه میانی و میتوکندری‌ها توسط نیتريك اكساید و پروکسی نیتريت نیز

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 گروه‌های دریافت کننده نیتريت و حتی گروه حداقل نسبت به گروه حداکثر، اضافه وزن بیشتری را داشته است اما این داده‌ها معنی دار نشده‌اند. این داده با سایر مطالعات نیز همخوانی داشت زیرا بر اساس مطالعات Carlestrom و همکاران کاهش وزن بدن در موش‌های تیمار شده با نترات سدیم نسبت به گروه کنترل گزارش شد که این کاهش وزن بدن در موش‌های تیمار شده، بر پایه کاهش توده چربی احشایی و کاهش تری گلسرید (TG) در حال گردش در بدن بود (۱۳). همچنین در مطالعه دیگری که طی ۱۴ هفته استفاده از آب حاوی نیتريت سدیم در موش صحرایی نر و ماده صورت گرفت، گروه کنترل در دو جنس نر و ماده نسبت به گروه تیمار شده افزایش وزن بیشتری را نشان داد که این کاهش وزن گروه‌های تیمار به دلیل کاهش فعالیت فسفاتاز آلكالین سرم و در نتیجه کاهش غذا خوردن آنها است (۱۴). در مجموع در این مطالعه گروه کنترل نسبت به گروه‌های تیمار شده، افزایش وزن بیشتری را نشان داد که این کاهش وزن گروه‌های تیمار شده می‌تواند ناشی از تأثیر نیتريت سدیم بر کاهش فعالیت فسفاتاز آلكالین، تأثیر نیتريت سدیم بر کاهش توده چربی احشایی و کاهش TG در حال گردش در

مختلف بر روی سیستم قلبی و عروقی تأثیر می‌گذارد و باعث ایجاد و راه اندازی فرآیند مرگ سلولی می‌شود و آسیب‌هایی از قبیل اتصال پلاکت‌ها و منوسیت‌ها، ترومبوسیت و آسیب‌های بافتی را به وجود آورده و باعث اتساع عروق می‌شود که این اتساع وابسته به کاهش f-اکتین در ماهیچه صاف عروق و افزایش محتوی G-اکتین می‌باشد و حالت غیریکنواخت لایه مدیا در گروه تجربی ۳۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌تواند ناشی از تأثیر نیتریک اکساید و پروکسی نیتريت بر سیستم قلبی و عروقی باشد.

### نتیجه‌گیری

از زمانی که ثابت شد کاربرد مقدار زیاد نیترات و نیتريت در فرآورده‌های گوشتی ایجاد مسمومیت می‌کند، کنترل مقدار آنها اهمیت پیدا کرد. اکسیداسیون هموگلوبین گلبول‌های قرمز خون با نیتريت و تبدیل آن به هموگلوبین و در نتیجه، اکسیداسیون در بدن عامل ایجاد مسمومیت است. از این رو، در اکثر کشورها حد مجازی برای مصرف ترکیبات شیمیایی در نظر گرفته شده است و این مقدار در محصولات گوشتی حدود ۵۰ ppm نیترات و ۲۰۰ ppm نیتريت است. با توجه به این استاندارد، حداکثر مقدار نیتريت سدیم یا پتاسیم مصرفی حدود ۲۳۹/۷ گرم برای هزار لیتر محلول عمل آوری (روش عمل آوری مرطوب)، ۶۲/۸ گرم برای هزار کیلوگرم گوشت در روش عمل آوری خشک و ۱۵/۷ گرم برای هزار کیلو گوشت خرد شده در محصولاتی از قبیل سوسیس و کالباس است. ۱۵ تا ۲۰ میلی‌گرم نیتريت، به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، کشنده اعلام شده است و معمولاً مقدار نیتريتی که در عمل آوری محصولات گوشتی به کار می‌رود، حدود ۲۰ تا ۴۰ برابر از این مقدار کمتر است. در بعضی از گزارش‌ها مقدار مجاز مصرف روزانه نیترات سدیم را به ازای هر کیلوگرم وزن بدن انسان حدود ۰/۲-۰ میلی‌گرم/کیلوگرم تخمین زده‌اند. بر اساس تحقیق حاضر و دیگر مطالعات صورت گرفته به نظر می‌رسد نیتريت یک عامل خطر در انسان باشد و یافتن جایگزین مناسب نظیر گیاهان داروی پیشنهاد می‌گردد.

می‌تواند از عوامل کاهش ضخامت لایه میانی محسوب شود (۱۸). مطالعات میکروسکوپی بر روی سرخرگ ششی در گروه حداکثر (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 غیریکنواخت را نشان می‌دهد و مقادیری از تجمع لنفوسیت 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 سوپراکسایدها و تشکیل پروکسی نیتريت، اثر سمیت آن به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد. پروکسی نیتريت به طور نسبتاً آهسته با بیشتر مولکول‌های بیولوژیک واکنش داده و به عنوان یک اکسیدکننده انتخابی شناخته شده است. پروکسی نیتريت، تیروزین پروتئین‌ها را تغییر داده و نیتروزین‌ها را به وجود می‌آورد که در بدن نیز قابل تشخیص می‌باشند. نیتروزین دار کردن ساختاری پروتئین‌ها از قبیل نروفیلان‌ها و اکتین، باعث از هم گسیختگی مجموعه فیلامنتی شده و در نتیجه باعث بیماری‌های عظیمی می‌شود (۱۹). پروکسی نیتريت (ONO<sup>-</sup>) به طور آزادانه از غشا دو لایه فسفولیپیدی عبور می‌کند و با مولکول‌های هدف بسیاری از قبیل لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA واکنش می‌دهد که در نهایت منجر به مرگ سلولی از طریق Necrosis و یا Apoptosis می‌شود (۱۸). Ma در طی تحقیقات خود گزارش داد که دلیل اصلی آسیب لایه اندوتلیال و ماهیچه‌های صاف عروق، تحت شرایط پاتولوژیک، تولید زیاد پروکسی نیتريت (ONO<sup>-</sup>) در دیواره عروق می‌باشد (۱۰). Maneen مطالعه‌ای نشان داد که پروکسی نیتريت بر روی بافت عضلانی صاف سرخرگ‌های مغزی از طریق دپلمیرازسیون f-اکتین تأثیر می‌گذارد. پروکسی نیتريت باعث اتساع عروق می‌شود که این اتساع وابسته به کاهش f-اکتین در ماهیچه صاف عروق و افزایش محتوی G-اکتین می‌باشد (۱۹). همچنین پروکسی نیتريت α-اکتین در میوسیت‌های قلبی را غیرفعال می‌سازد (۲۰). به طور کلی بر اساس مطالعات انجام شده پروکسی نیتريت و نیتریک اکساید به وسیله مکانیسم‌های

## References:

- 1- Islami AM, Mustafa AM. *Microscopic studies of the effect of some food additives on the kidney of albino rat.* Egypt J Hospital Med 2003; 12: 12-27.
- 2- Lundberg JO. *Cardiovascular prevention by dietary nitrate and nitrite.* Am J Physiol Heart Circ Physiol 2009; 296(5): H1221-23.
- 3- Nassehinia HR, Mehdiinia M, Ghorbani R, Norisepehr M. *Nitrite concentration in distributed sausage in semnan province.* Payesh 2008; 7(3): 197-202. [Persian]
- 4- 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.
- 5- Alexander J, Benford D, Cockburn A, Cravedi JP, Dogliotti E, et al. *Scientific opinion Nitrite as undesirable substances in animal feed . European food safety authority EFSA.* The Efsa Journal 2009; 10. 2903.1017.
- 6- 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.
- 7- Chan PC, Bristol DW, Bucher JR, Chapin RE, Hailey JR, Haseman JK. *Toxicology and carcinogenesis studies of sodium nitrite in F344/N rats and B6C3F 1 mice.* NTP Technical Report 2001; NIH Publication No. 01-3954.
- 8- Alef MJ, Carchman E, Glodwin MT, Tzeny E, Zuekerbraun BS. *Dietary nitrates and nitrites modulate vascular intimal hyperplasia.* J Am College Surgeons 2010; 211(3): S138.
- 9- Borbély A, Toth A, Edes I, Virag L, Papp JC, Varro A, et al. *Peroxynitrite-induced alpha-actinin nitration and contractile alterations in isolated human myocardial cells.* Cardiovasc Res 2005; 67(2): 225-33.
- 10- Ma X, 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): 879-85.
- 11- Litwin M, Niemirska A. *Intima-media thickness measurements in children with cardiovascular risk factors.* Pediatr Nephrol 2009; 24(4): 707-19.
- 12- Ghasemi A, Hdayati M, Khoushbaten A. *Evaluation of a simple and rapid method for serum nitricoxide determination using microplate.* IJEM 2006; 7(Suppl 4): 433-9.
- 13- Carlström M, Persson AE, Larsson E, Hezel M, Scheffer PG, Teerlink T, et al. *Dietary nitrate attenuates oxidative stress, prevents cardiac and renal injuries, and reduces blood pressure in salt-induced hypertension.* Cardiovasc Res 2011; 89(3): 574-85.
- 14- Helal E, Zahkak S, Soliman GZ, Abdolwahed H. *Biochemical studies on the effect of sodium nitrite and/or glutathione treatment on male rats.* Egypt J Hospital Med 2008; 30: 25-38.
- 15- Stokes KY, Dugas TR, Tang Y, Garg H, 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- 8.
- 16- 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*. Hypertension Res 2008; 31(2): 271-9.
- 17- 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): 264-9.
- 18- Beckman J, Koppenol WH. *Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly*. Am J Physiol Cell Physiol 1996; 271(5 Pt): e1424-370.
- 19- 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): 894-9.
- 20- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. *Nitric Oxide and peroxynitrite in Health and Disease*. Physiol Rev 2007; 87(1): 315-424.

## ***Investigating Sodium Nitrite Effect on Blood Nitric Oxide and Histopathologic Changes on Pulmonary Artery in Adult Male Rats***

Juibar F(MSc)<sup>1</sup>, Khatamsaz S(PhD)<sup>2</sup>, Ghorbaniranjbry A(PhD)<sup>\*3</sup>

<sup>1,2</sup>Department of Biology, Islamic Azad University, Kazerun Branch, Kazerun, Iran.

<sup>3</sup>Department of Veterinary, Young Researchers Club, Islamic Azad University, Kazerun Branch, Kazerun, Iran

**Received:** 6 Dec 2012

**Accepted:** 10 Oct 2013

### ***Abstract***

**Introduction:** Additives such as nitrites compounds are used in meat products in order to create the desired color, creating the desired taste, prevent the growth of Clostridium botulinum spores and increase the storage time of the products. Today, due to the indiscriminate use of nitrogenous fertilizers, it is widely spread in water, soil and ecosystems, and the lives of many people could be put at risk. Therefore, this study was performed in order to examine the histopathological effect of sodium nitrite on Pulmonary artery in male rats.

**Methods:** This is a cross - sectional study in which 30 adult male and female rats strain Vistar were divided into 3 groups of 10 which involved 2 recipient groups who were given 175 mg/kg/day dose and 350 mg/kg/day dose of nitrite. The control group absorbed nitrite through drinking water. The 3 groups were examined for 60 days. At the end of day 60, after Anesthesia, the blood sample was collected from heart. The arteries were taking out of body, and then tissue sections were prepared for testing tissue changes. The samples were stained with HematoxilinEozin method and thickness of internal media (intima media thickness) was measured with Image tool software. Factors such as morphometric and morphologic from arteries, body weight changes were investigated before and after test and also blood nitric oxide level was checked. At the end, the obtained results were analyzed through spss 17 software by T-test and Anova test.

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

**Conclusion:** Based on the results of different doses of sodium nitrite, the nitric oxide levels in the blood were increased, and the thickness of middle layer of the lung arteries at dose 350 mg of sodium nitrite was reduced.

**Keywords:** Media Intima; Nitric Oxide; Pulmonary Artery; Rat; Sodium Nitrite

**This paper should be cited as:**

Juibar F, Khatamsaz S, Ghorbaniranjbry A. *Investigating sodium nitrite effects on blood nitric oxide andp histopathologic changes on Pulmonary artery in adult male rats*. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2013; 21(5): 609-18.

**\*Corresponding author: Tel: +98 9361090113, Email: dr\_alighorbani87@yahoo.com**