مجلـــه‌ی علمـــی، پژوهشـــی دانشـگاه علـــوم پزشـــکی زنجـــان
دوره‌ی ۲۵, شماره‌ی ۱۰۹, خرداد و تیر ۱۳۹۶, صفحات ۱۱۱ تا ۱۲۱

بررسی اثرات نیتریت سدیم برمیزان نیتریک اکساید و آنزیم‌های کبدی سرم و تغییرات هیستوپاتولوژیکی بافت کبد در موش‌های صحرایی نر بالغ

فاطمه جویبار[۱]، دکتر حسین فتاحی[۲]، فرشاد ساداتی[۳]

نویسنده‌ی مسئول: باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون، ایران dr.f.juibar@gmail.com

دریافت: ۹٤/۱۲/۳ پذیرش: ۹۵/۵/۵

چکیده

زمینه و هدف: *نیترات و نیتریت در صنایع غذایی، دارویی و شیمیایی مصرف گسترده‌ای دارند. مطالعه‌ی حاضر جهت بررسی اثرات هیستوپاتولوژیکی نیتریت سدیم بر بافت کبد و اندازه‌گیری همزمان میزان آنزیم‌های کبدی و نیتریک اکساید در خون موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار انجام گرفت.*

روش بررسی: *در این مطالعه‌ی تجربی ۳۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار را به‌طور تصادفی به سه گروه ۱۰ تایی شامل گروه کنترل و گروه‌های تجربی دریافت کننده‌ی دوز ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیتریت سدیم تقسیم که نیتریت سدیم را به‌صورت روزانه به‌مدت ۶۰ روز در آب آشامیدنی دریافت کردند. در انتها با رعایت اصول اخلاقی، نمونه خون برای بررسی فاکتورهای AST, ALP و ALT و میزان نیتریک اکساید جدا گردید. پس از کشته شدن موش‌های صحرایی بافت کبد هم جهت بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیکی با رنگ آمیزی هماتوکسیلین – ائوزین بیرون آورده شد و نتایج به‌دست آمده مورد بررسی آماری قرار گرفت.*

یافته‌ها: *مصرف نیتریت سدیم در گروه دریافت کننده‌ی هر دو دوز باعث افزایش معناداری در آنزیم‌های AST ,ALP, ALT و نیتریک اکساید در مقایسه با گروه کنترل شد ($P\leq ۰/۰۵$). در گروه دریافت کننده‌ی دوز ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، اتساع و احتقان سینوزوییدها همراه با ارتشاح سلول‌های التهابی تک هسته‌ایی و پرولیفراسیون سلولی جدار سینوزوئیدها دیده شد.*

نتیجه‌گیری: *نیتریت سدیم با افزایش میزان نیتریک اکساید و تاثیر بر هپاتوسیت‌ها به‌عنوان یک فاکتور خطر برای کبد محسوب و می بایستی مواد مناسب و سالم در صنایع غذایی جایگزین گردد.*

واژگان کلیدی: ***هیستوپاتولوژی، نیتریت، آنزیم‌های کبدی، نیتریک اکساید، سمیت کبدی***

مقدمه

امروزه استفاده از افزودنی‌ها در مواد غذایی به شدت افزایش یافته است، و انسان‌ها به‌طور گسترده‌ای در معرض نگهدارنده‌هایی از قبیل نیتریت سدیم قرار گرفته‌اند (۱). نیتریت در مرکز واکنش‌های اکسیداسیون و احیا قرار گرفته است که می‌تواند به رادیکال بسیار فعال و بیولوژیکی نیتریک اکساید احیا یا به‌طور فراوان به آنیون نیترات اکسید شود (۲).

۱- دانشجوی دکترای زیست شناسی گرایش فیزیولوژی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون
۲- دکترای میکروبیولوژی، استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون
۳- دانشجوی دکترای دامپزشکی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون

نیتریت یک آنتی‌اکسیدان بسیارخوب است و از اکسیده شدن چربی‌های فرآورده‌های گوشتی، در طول نگهداری آن‌ها جلوگیری می‌کند (۳) میزان سمیت نیتریت نسبت به نیترات، تا ده برابر بیشتر می‌باشد (۴) و امروزه به واسطه‌ی مصرف کودهای نیتراته، این ماده به‌صورت گسترده به بدن انسان‌ها و حیوانات وارد می‌شود (۵). بعد از مصرف یک وعده‌ی 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 تا ۶ ساعت می‌باشد). علاوه بر این میزان نیتریت پلاسما نیز پس از مصرف نیترات افزایش می‌یابد (۷و۶). هنگامی که PH معده اسیدی باشد و باکتری‌های روده‌ای در روده موجود باشند، نیتریت به آسانی با آمین‌های ثانویه و آمیدها واکنش می‌دهد و ترکیبات سرطان زای ان - نیتروز N- (nitrose) را تولید می‌کند، سرعت تشکیل نیتروزاسیون با آمین‌های ثانویه متناسب با مجذور غلظت نیتریت می‌باشد. (۶و ۱). کبد ارگانی است که مواد غذایی جذب شده در دستگاه گوارش، در آن مورد پردازش قرار می‌گیرند و جهت استفاده‌ی دیگر اندام‌های بدن، ذخیره می‌شود. کبد بزرگترین ارگان غده‌ای بدن است که در حفره‌ی شکم و زیر دیافراگم قرار دارد. کبد متابولیت‌ها را جمع کرده، تغییر داده، انباشته می‌کند و مواد سمی را خنثی و برداشت می‌نماید (۷). مطالعات متعدد اثرات گشاد کنندگی عروق، در دوزهای پایین نیتریت در موش‌های صحرایی، گوسفند، سگ، پریمات و انسان را تایید کرده است. بیش از پنجاه سال است که دانشمندان نقش فیزیولوژیکی این یون در اتساع عروق را بررسی می‌کنند (۸). در مطالعاتی که در سال ۲۰۰۱ به بررسی اثر نیتریت سدیم به مدت ۱۴ هفته بر روی موش‌های صحرایی پرداخته شد، مشخص گردید که نیتریت سدیم باعث تخریب بافت بیضه و کاهش حرکت اسپرم‌ها می‌شود و در ماده‌ها نیز طول سیکل جنسی را افزایش می‌دهد (۹). همچنین در مطالعات صورت گرفته در سال ۲۰۱۵ نشان داده شد که، مصرف نیتریت سدیم، التهاب زمینه از نوع Monoulear را در بافت طحال در هر دو جنس نر و ماده، خصوصا در اطراف پالپ‌های طحال به‌وجود می‌آورد (۱۰). طبق پژوهش‌ها نیتریت سدیم در دوز ۳۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث کاهش ضخامت لایه‌ی میانی سرخرگ کلیوی می‌شود و به نظر می‌رسد که وجود نیتریت در مواد غذایی با دوز بالا می‌تواند مشکلات عروقی در افراد مصرف کننده ایجاد نماید و به‌عنوان یک عامل تهدید کننده‌ی سیستم عروقی به حساب آید (۱۱). در یک مطالعه که بر روی موش صحرایی تیمار شده با DMA-HCL و نیتریت سدیم بر روی آنزیم‌های کبدی صورت گرفت، نشان داده شد که در سلول‌های داخلی کبدی (Intra Hepatic Cell) به دلیل پیش ماده‌های ان- نیتروزامین، نکروز سلول‌ها و آسیب بافتی صورت می‌گیرد (۱۱).

همچنین مشخص شده است مصرف نیتریت سدیم باعث تغییرات در سطح LPO و آنزیم‌های آنتی اکسیدانی می‌شود. سطح LPO و فعالیت آنزیم‌های مارکر کبدی نظیر AST، اسید فسفاتاز LDL به‌طور معناداری افزایش یافته در حالی که آنزیم‌های آنتی اکسیدانت و فعالیت SOD (Super Oxide Dismutase) در موش صحرایی درمان شده با نیتریت سدیم کاهش می‌یابد (۱۱). در مطالعات دیگری اثرات نیترات و سرطان‌زایی ترکیبات ان- نیتروز آمین حاصل از تجزیه نیترات در کبد بر گونه‌های مختلف جانوران و اندام‌های مختلف از جمله کولون؛ معده؛ پانکراس و ریه بیان شده است. نیتریک اکساید در کبد نقش‌های متنوعی را بازی می‌کند از جمله این که می‌تواند نقش کاهش حفاظت از کبد و یا آسیب سلولی را ایجاد کند (۸). همچنین شواهد نشان می‌دهد که نیتریک اکساید می‌تواند آسیب‌های کبدی را از طریق مرگ سلولی القا کند. با افزایش نیتریک اکساید، پروکسی نیتریت افزایش می‌یابد و با نفوذ به‌صورت مستقیم به درون میتوکندری‌ها باعث شروع آسیب می‌شود (۵). گزارشات زیادی نشان

می‌دهد که افزایش میزان نیتریک اکساید می‌تواند مرگ سلولی را القا کند ولی هیچ‌گونه تحقیق مدونی به بررسی اثرات همزمان نیتریت سدیم برروی آنزیم‌های کبدی و به ویژه نیتریک اکساید و بافت کبدی نپرداخته است. از آن جایی که در مطالعات دیگر میزان نیتریک اکساید خون مورد بررسی قرار نگرفته بود، در این مطالعه میزان این فاکتور هم مورد بررسی قرار گرفت. لذا هدف از این مطالعه بررسی اثرات همزمان نیتریت سدیم برروی آنزیم‌های کبدی و به ویژه نیتریک اکساید و تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت کبد در موش صحرایی نر بالغ می‌باشد.

روش بررسی

در این پژوهش از ۳۰ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار با وزن تقریبی ۱۰±۲۴۰ گرم و سن حدود ۳ تا ۴ ماه که از خانه‌ی حیوانات دانشگاه علوم پزشکی اهواز تهیه و در شرایط آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی دانشگاه آزاد کازرون نگهداری شدند، استفاده گردید.جهت مانوس شدن حیوان با محیط جدید، موش‌ها به‌مدت شش روز قبل از شروع آزمایش در شرایط جدید نگهداری شدند. موش‌های صحرایی در قفس‌های پلی اتیلنی مخصوص و در شرایط استاندارد با درجه حرارت محیطی در زمان انجام آزمایش ۲۰ تا ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و شرایط نوری در چرخه‌ی زمانی ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی، به مدت ۶۶ روز (۶۰ روز برای آزمایش و ۶ روز برای سازگاری در محیط) نگهداری شدند. آب آشامیدنی به‌عنوان حلال نیتریت سدیم مورد استفاده قرار گرفت. به‌منظور بررسی میزان آب مصرفی توسط موش‌ها و اطمینان داشتن از مصرف نیتریت سدیم توسط آن‌ها، حیوان‌ها به‌صورت دوتایی در قفس نگه‌داری شدند و هر صبح دوز مناسب، برای هر قفس با میزان آب مورد مصرف ساخته می‌شد و هر صبح میزان آب مصرفی کنترل روز قبل مورد بررسی قرار می‌گرفت. برای هر سر موش صحرایی میزان نیتریت سدیم محاسبه شده در ۳۰ سی‌سی آب شرب شهرستان کازرون در نظر گرفته شد که این مقدار آب تا صبح روز بعد توسط موش صحرایی خورده می‌شد.

موش‌های صحرایی نر در۳ گروه ده تایی به شرح زیر طبقه‌بندی شدند:

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

۲) گروه تیمار با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای یک کیلوگرم: روزانه مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای یک کیلوگرم وزن بدن خود نیتریت سدیم به‌صورت محلول در آب آشامیدنی شهرستان کازرون به همراه رژیم غذایی سالم و طبیعی دریافت می‌کردند.

۳) گروه تیمار با دوز ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای یک کیلوگرم: روزانه مقدار ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای یک کیلوگرم وزن بدن خود، نیتریت سدیم به‌صورت محلول در آب آشامیدنی (۶) شهرستان کازرون به همراه رژیم غذایی سالم و طبیعی دریافت می‌کردند.

در ارتباط با تعیین دوز، از آن جا که در مقالات مختلف از دوزهای بسیار متنوع در حد ماکرولیتر تا ۲۰، ۳۰، ۲۲۸، ۳۴۰ و .. میلی‌گرم به ازای وزن بدن استفاده شده است، در این مطالعه با توجه به مد نظر بودن اثرات بافتی دو دوز ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر روز استفاده شد. در مورد مدت زمان آزمایش نیز در مورد این ماده بر روی بافت‌های بدن مطالعاتی از یک ماه، ۱۳ هفته، ۱۴ هفته و حتی دو سال نیز انجام شده است. نحوه‌ی تعیین دوز و مصرف نیتریت سدیم براساس مقادیر اشاره شده در تحقیق الکساندر و همکاران بوده است (۶). در این مطالعه با توجه به مد نظر بودن اثرات بافتی و کافی بودن مدت ۶۰ روز برای تغییرات بافتی (۱۲)، این زمان محاسبه گردید. پس از دوره‌ی ۶۰ روزه تیمار، در روز ۶۱ موش‌ها با استفاده از پنبه‌ی آغشته به اتر، بیهوش

گردیدند. از حیوان بیهوش شده خونگیری به عمل آمد و سرم جداسازی شد. پس از کشته شدن موش‌های صحرایی، بافت کبد را بیرون آورده و پس از شستشو با سرم فیزیولوژی، برای تهیه مقاطع بافتی در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد. سپس به‌منظور انجام آزمایشات بافت شناسی، کبد جهت پایدارسازی در فرمالین بافری ۱۰ درصد قرار داده شد و پس از آب‌گیری و قالب‌گیری، برش‌های میکروتومی به ضخامت ۵ میکرون تهیه و با رنگ مضاعف هماتوکسیلین- ائوزین رنگ آمیزی شدند، سپس جهت بررسی سلولی و بافتی با میکروسکوپ نوری دوربین دار Nikon ساخت ژاپن ارزیابی گردیدند. سپس جدا سازی سرم نیز صورت گرفت و جهت اندازه‌گیری آنزیم‌های، فعالیت سه آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آلکالین فسفاتاز (ALP) و نیتریک اکساید به آزمایشگاه دانشکده‌ی علوم پایه دانشگاه آزاد واحد کازرون ارسال گردید. و از روش‌های استاندارد و کیت‌های آنزیمی و بیوشیمیایی (شرکت پارس آزمون، ساخت ایران) توسط دستگاه اتوآنالیزر مدل RA-1000 ساخت شرکت Technicon کشور آمریکا استفاده گردید. (اندازه‌گیری میزان نیتریک اکساید خون (NO) طبق واکنش گریس، در میکرو پلیت الیزا انجام شد) در این روش برای پروتئین‌زدایی ۴۰۰ میکرولیتر نمونه با ۶ میلی‌گرم پودر سولفات روی مخلوط گردید و پس از مخلوط شدن به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و از محلول فوقانی جهت اندازه‌گیری (NOx) استفاده شد. سپس به ۱۰۰ میکرولیتر سرم پروتئین‌زدایی شده در میکروپلیت الیزا، ۱۰۰ میکرولیتر محلول کلرید وانادیوم اضافه شد و ۵۰ میکرولیتر سولفانامید (۰/۱ گرم در ۵ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۵ درصد) و متعاقب آن ۵۰ میکرولیتر (N NEDD-1naphtyl ethylenediamine) (۰/۰۰۵ گرم در ۵ میلی‌لیتر آب مقطر) افزوده شد و بعد از آن به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد تحت انکوبه قرار گرفت. بعد از انجام واکنش گریس و تشکیل جذب رنگ، جذب نوری حاصل از تشکیل ماده رنگی در ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا خوانده و با استفاده از منحنی استاندارد غلظت نمونه‌ها محاسبه شد (۱۳)

محاسبات آماری: پس از ثبت داده‌ها نتایج در نرم افزار SPSS (USA,I1, Chicago, SPSS Inc) نسخه‌ی ۱۷ مورد بررسی و آنالیز آماری قرار گرفتند. برای بررسی میزان نیتریک اکساید خون و آنزیم‌های کبدی در گروه‌های مختلف با کنترل، آزمون آنالیز واریانس یک طرفه مورد استفاده قرار گرفت و $P\leq ۰/۰۵$ به‌عنوان اختلاف معنی‌دار آماری گزارش شد.

یافته‌ها

به منظور بررسی تاثیر نیتریت سدیم بر فعالیت فاکتورهای اختصاصی بیوشیمیایی سرم حیوانات مورد آزمایش، فعالیت سه آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آلکالین فسفاتاز (ALP) مورد ارزیابی قرار گرفت همچنین تغییرات وزن کبد و وزن بدن نیز مورد بررسی قرار گرفت که هیچ گونه تغییرات معناداری بین سه گروه مورد مطالعه دیده نشد (جدول ۱).

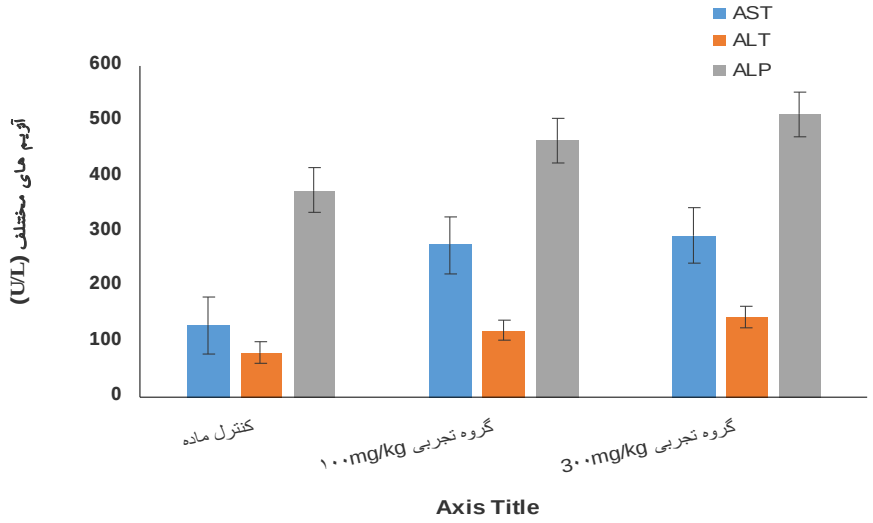
تغییرات غلظت آنزیم‌های کبدی: بعد از دریافت نیتریت سدیم از طریق آب آشامیدنی میانگین میزان ALT در گروه کنترل و در گروه‌های تجربی دریافت کننده‌ی حداقل و حداکثر دوز نیتریت سدیم، اندازه‌گیری شد و نتایج آن به ترتیب برابر با ۳/۵۵ ± ۸۰/۳ و ۳/۰۹ ± ۱۲۱/۱۹ و ۲/۲۰ ± ۱۴۶/۰۱ به دست آمد. همان‌طورکه در نمودار ۲ مشاهده می‌شود بین غلظت پلاسمایی آنزیم کبدی ALT درگروه‌های تجربی دریافت کننده‌ی حداقل و حداکثر نیتریت سدیم نسبت به گروه کنترل در سطح $P\leq ۰/۰۵$ اختلاف معناداری دیده می‌شود.

جدول ۱: تغییرات وزن کبد و بدن حیوانات آزمایشگاهی

وزن (گرم) (Mean±SE)	کنترل	گروه ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیتریت سدیم	گروه ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیتریت سدیم
کبد	۷/۵۸±۰/۳۶	۶/۹۰ ± ۰/۱۳	۷/۴۵± ۰ /۷۰
بدن	۲۱۰ ± ۲/۷۳	۲۲۰ ± ۰/۵۰	۱۹۸/۵ ± ۲/۹۸

تغییرات وزن کبد و وزن بدن در(سطح P≤ ۰/۵) معنی‌دار نبودند.

همچنین میانگین میزان AST در گروه کنترل و درگروه‌های تجربی دریافت کننده‌ی نیتریت سدیم ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز به‌ترتیب برابر با ۵/۴۱ ± ۱۳۰/۳ و ۴۲/۲۳ ± ۲۷۵/۵ و ۴۳/۷۰ ± ۲۹۳/۰۲ می‌باشد، که در مقایسه غلظت پلاسمایی آنزیم کبدی AST درگروه‌های تجربی دریافت کننده‌ی حداقل و حداکثر نیتریت سدیم نسبت به گروه کنترل در سطح P≤۰/۰۵ اختلاف معناداری دیده می‌شود. همچنین میزان آنزیم ALP گروه کنترل برابر با ۳۰/۳۶ ± ۳۷۵ و درگروه‌های تجربی دریافت کننده‌ی نیتریت سدیم ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌ترتیب برابر با ۴۸/۶ ± ۴۶۹ و ۴۲/۳ ± ۵۱۲/۵ می‌باشد، که بین غلظت پلاسمایی آنزیم کبدی ALP درگروه‌های تجربی دریافت کننده‌ی حداقل و حداکثر نیتریت سدیم نسبت به گروه کنترل در سطح P≤۰/۰۵ اختلاف معناداری دیده می‌شود (نمودار ۱)

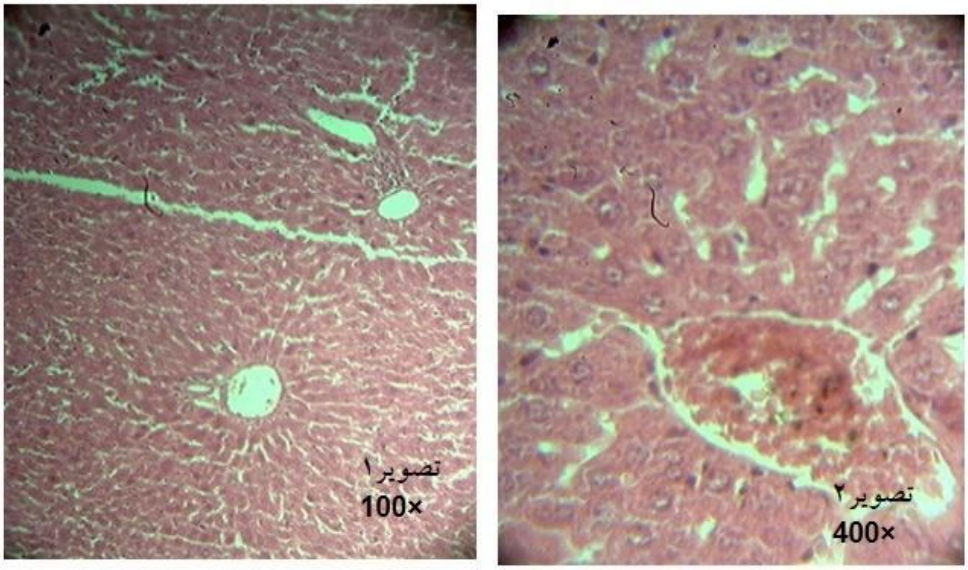


نمودار ۱: مقایسه‌ی میانگین AST , ALT و ALP در گروه‌های تجربی مختلف در موش صحرایی اختلاف معناداری در سطح P≤۰/۰۵ نسبت به گروه کنترل را نشان می‌دهد.

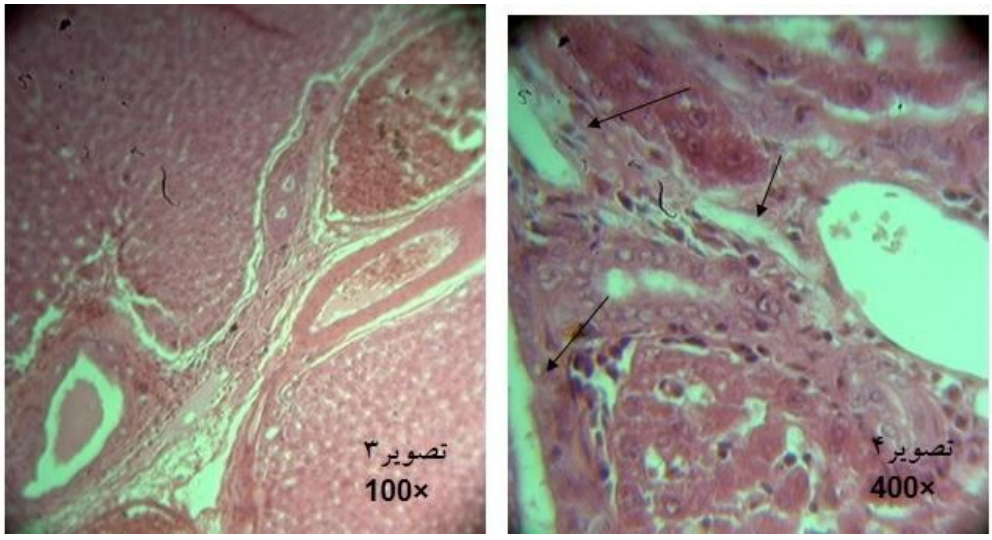
میانگین آنزیم‌های کبدی AST , ALT و ALP در گروه‌های تجربی مختلف در موش صحرایی نر نژاد ویستار اختلاف معناداری را در سطح P≤۰/۰۵ نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد، به‌طوری که غلظت پلاسمایی هر سه آنزیم به‌صورت

معناداری نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است.

تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت کبد: در بررسی ماکروسکوپی نمونه‌ها در هیچ یک از نمونه‌های جدا سازی شده تغییر رنگ و قوامی مشاهده نشد. در بررسی با میکروسکوپ نوری در نمونه‌های گروه کنترل و گروه دریافت کننده‌ی میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیتریت سدیم (تصویر ۱ و ۲) هیچ ضایعه‌ای مشاهده نگردید، اما نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که دریافت نیتریت سدیم از طریق آب آشامیدنی با دوز ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌تواند اثرات مخرب خود را بر بافت کبد القا کند. در تصاویر ۳ و ۴ که از نمونه‌های گروه دریافت کننده‌ی میزان ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیتریت سدیم تهیه گردیده است، اتساع و احتقان سینوزوییدها همراه با ارتشاح سلول‌های التهابی تک هسته‌ای و پرولیفراسیون سلولی جدار سینوزوئیدها و التهاب زمینه مشاهده می‌گردد.

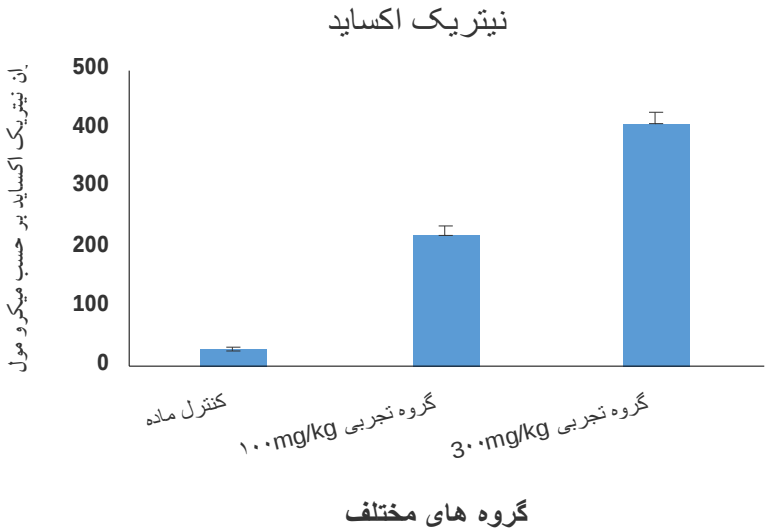


تصویر ۱ و ۲ بافت کبد در گروه کنترل به ترتیب با بزرگنمایی۱۰۰ و ۴۰۰ را نشان می‌دهد که هیچ گونه ضایعه‌ای قابل مشاهده نیست



تصویر ۳ و ۴ بافت کبد در گروه در یافت کننده‌ی دوز ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به ترتیب با بزرگنمایی۱۰۰ و۴۰۰ نشان می‌دهد. فلش‌ها اتساع و احتقان سینوزوییدها را نشان می‌دهند.

تغییرات غلظت نیتریک اکساید خون: بعد از دریافت نیتریت سدیم از طریق آب آشامیدنی با اندازه گیری میزان نیتریک اکساید؛ میزان این ماده در گروه کنترل برابر با ۴/۱۶ ± ۲۷/۵۵ میکرومول و در گروه‌های تجربی دریافت کننده‌ی دوز حداقل و حداکثر نیتریت سدیم، برابر با ۱۵/۰۶ ± ۲۲۰/۵۹ و ۲۰/۱۷ ± ۴۱۰/۸۲ میکرومول به دست آمد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد، میزان میانگین نیتریک اکساید در گروه‌های تجربی دریافت کننده‌ی دوز حداقل و حداکثر نسبت به گروه کنترل دارای تغییرات معنی‌داری با P≤۰/۰۵ می‌باشد (نمودار ۲).



نمودار ۲: مقایسه‌ی میانگین غلظت نیتریک اکساید خون درگروه حداکثر و حداقل با گروه کنترل در موش صحرایی نر

میزان میانگین نیتریک اکساید درگروه‌های تجربی دریافت کننده‌ی دوز حداقل و حداکثر نسبت به گروه کنترل دارای تغییرات معنی‌داری در سطح P≤۰/۰۵ می‌باشد و اختلاف معناداری در سطح P≤۰/۰۵ نسبت به گروه کنترل نشان دادند.

بحث

در مطالعه‌ی حاضر، مشخص گردید که دریافت نیتریت سدیم از طریق آب آشامیدنی، باعث ایجاد تغییرات معنی‌داری در میانگین غلظت پلاسمایی نیتریک اکساید در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل در پایان آزمایش می‌شود. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۹ توسط استوک و همکارانش انجام گرفت گزارش داده شد که مصرف نیتریت سدیم به صورت محلول در آب آشامیدنی میزان نیتریت و نیترات در پلاسما، را افزایش می‌دهد (۱۴) در مطالعه‌ی حاضر میزان مصرف نیتریت سدیم و دوز آن مطابق تحقیق الکساندر و همکاران بوده که نیتریت سدیم را به‌صورت محلول در آب آشامیدنی دریافت کردند (۶). در این مطالعه نیز در گروه‌های تجربی تیمار شده با نیتریت سدیم به دلیل مصرف نیتریت سدیم از طریق آب آشامیدنی غلظت نیتریک اکساید سرم افزایش یافت، در حالی که در گروه‌های کنترل غلظت نیتریک اکساید در سطح نرمال بود که با سایر مطالعات همخوانی دارد (۱۴و۶).

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که تجویز نیتریت سدیم به‌صورت محلول در آب آشامیدنی، به مدت ۶۰ روز در موش‌های صحرایی نر بالغ باعث ایجاد تغییرات محسوسی در

بافت کبد می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد که اثرات سمیت نیتریک اکساید به‌طور مستقیم، نسبتا زیاد نمی‌باشد، اما در اثر واکنش با سوپر اکسایدها و تشکیل پروکسی نیتریت، اثر سمیت آن به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد. پروکسی نیتریت به‌طور نسبتا آهسته با بیشتر مولکول‌های بیولوژیک واکنش داده و به‌عنوان یک اکسید کننده‌ی انتخابی شناخته شده است. پروکسی نیتریت، تیروزین پروتئین‌ها را تغییر داده و نیتروزین‌ها را به‌وجود می‌آورد که در بدن نیز قابل تشخیص می‌باشند (۱۵). در مطالعه‌ی کنونی نیز درگروه دریافت کننده‌ی دوز ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیتریت سدیم؛ اتساع و احتقان سینوزوییدها همراه با ارتشاح سلول‌های التهابی تک هسته‌ای و پرولیفراسیون سلولی جدار سینوزوئیدها دیده شد که این آسیب بافتی می‌تواند ناشی از افزایش میزان نیتریک اکساید و ترکیباتی از قبیل پروکسی نیتریت باشد. نیتریت سدیم می‌تواند سلول‌های داخلی کبدی را به دلیل وجود پیش ماده‌های ان- نیتروزآمین به سمت نکروز سلول‌ها و آسیب بافتی پیش برد (۱۶). نیتریک اکساید در کبد نقش‌های متنوعی دارد، از جمله این که می‌تواند نقش کاهش محافظت از کبد و یا آسیب سلولی را ایفا کند (۸). شواهدی نشان می‌دهد که نیتریک اکساید می‌تواند آسیب‌های کبدی را از طریق مرگ سلولی را القا کند. با افزایش نیتریک اکساید پروکسی نیتریت افزایش می‌یابد و با نفوذ به‌صورت مستقیم به درون میتوکندری‌ها آسیب را به‌وجود می‌آورد (۵). در این مطالعه میزان نیتریک اکساید سرم در گروه دریافت کننده‌ی نیتریت سدیم با دوز ۳۰۰ میلی‌گرم به‌طور معناداری افزایش یافت، از آن جا که با افزایش میزان نیتریک اکساید پروکسی نیتریت نیز افزایش می‌یابد می‌توان نتیجه گرفت احتمالا تولید مشتقات نیتریک اکساید از قبیل پروکسی نیتریت و ان- نیتروزآمین می‌تواند منجر به آسیب سلول‌های کبدی شود. از طرف دیگر نیتریت می‌تواند مت هموگلوبینمی را در اطفال و در انسان بالغ و نیتروز آمین سرطان‌زا را به وجود آورد (۱۷).

طبق نظریه‌ی آقای روشا در سال ۲۰۱۲ پراکسیداسیون لیپیدها می‌تواند باعث آسیب رسانی به کبد و کلیه شود (۱۸). اما گزارشات دیگر نشان داد که تزریق نیتریت سدیم، جهشی را در ژن آنزیم‌های کبدی همستر القا نمی‌کند (۹). افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های ALT و AST می‌تواند تائید کننده افزایش نفوذ پذیری سلول یا نکروز شدن سلول‌های کبدی باشد و تغییر در میزان این آنزیم‌ها جهت ارزیابی عملکرد کبد مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۹).

کریشنا مورتی و همکارانش در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که مصرف نیتریت سدیم باعث تغییرات در سطح LPO و آنزیم‌های آنتی اکسیدانت می‌شود. سطح LPO و فعالیت آنزیم‌های مارکر کبدی مانند AST، اسید فسفاتاز LDH به‌طور معناداری افزایش می‌یابد در حالی که آنزیم‌های آنتی اکسیدانت و فعالیت SOD(Super Oxide Dismutase) در موش صحرایی درمان شده با نیتریت سدیم کاهش می‌یابد. به‌طور کلی بر اساس مطالعات انجام شده پروکسی نیتریت و نیتریک اکساید به‌وسیله مکانیسم‌های مختلف بر روی بافت کبد تاثیر می‌گذارند و باعث ایجاد و راه اندازی پروسه‌ی مرگ سلولی می‌شوند و آسیب‌هایی بافتی را به وجود می‌آورند (۲۰) در این مطالعه میزان میانگین AST ALT و ALP در گروه‌های تجربی مختلف در موش صحرایی در مقایسه با گروه کنترل به‌صورت معناداری افزایش یافته بود. از آن جا که آنزیم‌های ALT, AST, ALP علامت‌های سلامت کبد و عملکرد طبیعی کبد می‌باشند، افزایش معنادار این آنزیم‌ها می‌تواند نشان دهنده اختلالات کبدی باشد.

در مطالعات صورت گرفته در سال ۲۰۱۱ توسط اوزونومنا که بر روی موش صحرایی تیمار شده با DMA-HCL و نیتریت سدیم بر روی آنزیم‌های کبدی صورت گرفت، مشخص شد که در سلول‌های داخلی کبدی به دلیل پیش ماده‌های ان- نیتروزآمین، نکروز سلول‌ها و آسیب بافتی صورت می‌گیرد و آنزیم‌های کبدی هم تغییر می‌کنند (۱۶). در این

مطالعه نیز میزان نیتریک اکساید در سرم موش‌های صحرایی در گروه دریافت کننده‌ی نیتریت سدیم افزایش یافت که می‌توان افزایش آنزیم‌های کبدی AST ALT و ALP را به دلیل افزایش میزان نیتریک اکساید سرم و تولید مشتقات نیتریت دانست. در مطالعه‌ی حاضر نیز اثرات مضر نیتریت بر روی بافت کبد و آنزیم‌های کبدی قابل مشاهده بود که با مطالعات قبلی همخوانی داشت. در این مطالعه علاوه بر اندازه‌گیری میزان آنزیم‌های AST ALT و ALP میزان نیتریک اکساید سرم نیز اندازه‌گیری شد، در صورتی که در مطالعات قبلی برای بررسی اثرات نیتریت سدیم تنها تغییرات هیستوپاتولوژیکی بافت و آنزیم‌های کبدی مورد بررسی قرار گرفته بود. اما در این مطالعه با اندازه‌گیری میزان نیتریک اکساید سرم همزمان با دیگر فاکتورهای کبدی با صراحت می‌توان نتیجه گرفت، بروز این اثرات سمی بر بافت کبد به دلیل افزایش نیتریت اکساید و مشتقات آن می‌باشد. همچنین می‌توان نیتریت سدیم را در دوزهای بالا و در نتیجه افزایش زیاد نیتریک اکساید در سرم را به‌عنوان عوامل مضر برای بافت کبد در نظر گرفت که لزوم جایگزینی نیتریت سدیم با سایر مواد نگهدارنده در مواد غذایی را می‌رساند.

تقدیر و تشکر

با تشکر و قدردانی از کارمندان محترم مرکز حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون که در انجام این کار ما را یاری نمودند.

References

1- Abd El-Tawab M. Microscopic studies of the effect of some food additives on the kidney of albino rat. *Egypt J Hospt Med.* 2003; 12: 12-27.

2- Dezfulian C, Raat N, Shiva S, Gladwin MT. Role of the anion nitrite in ischemia reperfusion cytoprotection and therapeutics. *Cardiovasc Res.* 2007; 75: 327-38.

3- Shahidi F. Flavor of meat, meat products and seafoods. 2nd ed Blackie Academic and Professional, London, UK. 1998.

4- Hortelano S, Dallaporta B, Zamzami N, et al. Nitric oxideinduces apoptosis via triggering mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett.* 1997; 410: 373-77.

5- Lundberg JO. Cardiovascular prevention by dietary nitrate and nitrite. Am J Physiol Heart and Circulatory. 2009; 296: 5. 1221-23.

6- Alexander J, Benford D, Cockburn A, et al. Scientific opinion nitrite as undesirable substances in animal feed. *Eur Food Safley Authority.* 2009; 1017: 1-47.

7- Mescher A. Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 13th Ed. English.mcgraw-Hill Medical Publishing. 2013; 100-30.

8- Knowles RG, Merrett M, Salter M, et al. Differential induction of brain, lung and liver nitric oxide synthase by endotoxin in therat. *Biochem J.* 1990; 270: 833-36.

9- National Toxicology Program. Toxicology and carcinogenesis studies of sodium nitrite (CAS NO. 7632 00 0) in F344/N rats and B6C3F1 mice (drinking water studies) Natl Toxicol Program Tech Rep. 2001; 495: 7-273.

10- Juibar F, Tavakoli kazerooni A, Ghorbani ranjbary A. Histopathological effects of sodium

nitrite on the spleen of male and female rats. ISMJ 2015; 17: 1160-1167(Persian).

11- Juibar F, Khatamsaz S, Sepehrara L. Histopathological effects of sodium nitrite on renal artery in rats. *J Mazand Univ Med Sci.* 2013; 23: 91-100 (Persian).

12- Ogur R, Coskun O, Korkmaz A, Oter S. High nitrate intake impairs liver functions and morphology in rats; protective effects of α-tocopherol. *Environ Toxicol Pharmacal.* 2005; 20: 161-166.

13-Juibar F, Khatamsaz S. Histopathological effects of sodium nitrite on renal artery in rats. *J Mazand Univ Med Sci*. 2013; 23: 91-100. (Persian).

14- 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: 1281-88.

15- Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1996; C1424-C37.

16- Usunomena U. Toxicity evaluation of the liver and in vitro metabolism in wistar rat on exposure to N Nitrosamine precursors. *Br J Pharmacol Toxicol.* 2011; 2:138-42.

17- Chan T. Vegetable-borne nitrate and nitrite and the risk of methaemoglobinaemia. *Toxicol Lett.* 2011; 107-109.

18- Rocha BS, Gago B, Barbosa RM, Lundberg JO, Radi R, Laranjinha J. Intragastric nitration by dietary nitrite: implications for modulation of protein and lipid signaling. *Free Radic Biol Med.* 2012; 52: 693-8.

19- Goldberg D, Watts C. (1965). Serum enzyme changes as evidence of liver reaction to oral alcohol. *Gastroenterology.* 1965; 49; 256-61.

20- Krishnamoorthy P, Sangeetha M. Hepatoprotective effect of vitamin C on sodium nitrite induced lipid peroxidation in albino rats. *Indian J Geo-Marine Sci.* 2008; 45: 0301-1208.

The Effects of Sodium Nitrite on Nitric Oxide Levels and Serum Hepatic Enzymes and Liver Histopathology in Adult Male Rats

Juibar F[1], Fattahi H[2], Sadaty F[3]

[1]Young Researchers and Elite Club, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran

[2]Dept. of Microbiology, Islamic Azad University, Kazerun Branch, Kazerun, Iran

[3]Dept. of Vterinary, Young Researchers and Elite Club, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran

Corresponding Author: Juibar F, Dept. of Biology, Young Researchers and Elite Club, Islamic Azad University, Kazerun Branch, Kazerun, Iran

E-mail: dr.f.juibar@gmail.com

Received: 22 Feb 2016 **Accepted:** 26 Jul 2016

Background and Objective: Nitrite is widely used in food, pharmaceutical and chemical products. This study was performed to examine the effects of sodium nitrite on liver histopathology and enzyme and nitric oxide in adult Wistar male rats.

***Materials and Methods*:** In this experimental study, 30 adult male Wistar rats were randomly divided into three experimental groups of 10, consisting of one control group and two experimental groups (one group receiving 100 mg/kg/day and the other 300 mg/kg/day of sodium nitrite in drinking water for 60 days). Blood samples were collected to determine serum levels of AST, ALT, ALP and nitric oxide. After sacrifying the rats, the rat's liver tissues were removed for histopathological evaluation (using Hematoxylin-Eosin staining). The obtained results were analyzed statistically.

Results: Use of sodium nitrite in both experimental groups caused a significant increase in serum AST, ALT, ALP and nitric oxide compared to the control group ($p \leq 0.0$) . In the group receiving 300 mg/kg/day of sodium nitrite, dilatation and congestion of hepatic sinusoids with infiltration of mononuclear inflammatory cells in addition to sinusoid cell proliferation was observed.

Conclusion: Sodium nitrite increases nitric oxide levels and damages hepatocytes, therefore it is a risk factor for liver disease and should be replaced with a suitable and healthy substance in the food industry.

Keywords: Histopathology, Nitrite, Liver Enzyme, Nitric oxide, Rat