دانشور پزشکی

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌ودوم–شماره ۱۱۵
اسفند ۱۳۹۳

دریافت: ۱۳۹۳/۰۹/۱۷
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۳/۱۰/۲۳
پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۰۱

بررسی اثر عصاره آبی سیر بر میزان نیتریک اکساید سرمی موش

نویسندگان: سکینه موئدمحسنی[۱]، حمیده روحانی[۲]، مرضیه اقتداردوست[۳]، سید محمدرضا عمادی[۲]، مهرداد روغنی[٤] و طوبی غضنفری[۵*]

۱. استادیار گروه زنان و زایمان، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۲. دانشجوی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۳. پژوهشگر مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
٤. استاد گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۵. استاد گروه ایمونولوژی و مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: طوبی غضنفری
E-mail: tghazanfari@yahoo.com

چکیده

مقدمه و هدف: در طب سنتی ایران، از سیر با نام علمی Allium Sativum برای درمان بیماری‌های مختلف، مانند عفونت‌ها، سرطان‌ها و ... یا شده‌است. نیتریک اکساید، طی پاسخ‌های ایمنی و التهابی تولیدمی‌شود. با توجه به اثرهای متعدد سیر و اعمالی مختلف که نیتریک اکساید در بدن انجام‌می‌دهد، برآن شدیم تا در این مطالعه، اثر عصاره سیر را برسطح سرمی متابولیت‌های نیتریک اکساید (نیترات و نیتریت) موش‌های balb/c بسنجیم.

مواد و روش‌ها: ۳۰ سر موش balb/c ماده شش تا هشت هفته به‌طور تصادفی به شش گروه تقسیم‌شدند؛ سه گروه، موش‌های گروه‌های دارو که روزانه،۲۰ میلی‌گرم برکیلوگرم عصاره سیر [دریافت‌می‌کردند و سه گروه نیز]، گروه‌های کنترل که هم‌حجم آن، سرم فیزیولوژی به‌صورت درون‌صفاقی می‌گرفتند. موش‌ها (گروه کنترل) در سه گروه مجزا ۲۴ ساعت، یک هفته و دو هفته پس از آخرین تجویز کشته‌شدند. پس از تهیه سرم، میزان نیتریت و نیترات هر سرم با روش گریس سنجیده و نتایج به‌دست‌آمده با آزمون آماری تی- استیودنت بررسی‌شدند.

نتایج: سطح نیتریت اولیه سرمی، ۲۴ ساعت و یک هفته پس از آخرین تجویز عصاره سیر ۷/۵ و ۲۹ درصد و سطح نیترات + نیتریت ۴۲ و ۱۲ درصد، نسبت‌به گروه کنترل افزایش‌یافته‌است. دو هفته پس از آخرین تجویز نسبت‌به گروه کنترل نیتریت اولیه ۲/۵ درصد کاهش ولی سطح نیترات + نیتریت به میزان ۴/۸ درصد افزایش‌یافته‌است. هیچ‌یک از اختلاف‌های مشاهده‌شده با آزمون T-Test از نظر آماری معنی‌دار نبود.

نتیجه‌گیری: عصاره سیر، موجب افزایش سطح سرمی متابولیت‌های نیتریک اکساید می‌شود ولی این تأثیر از نظر آماری، معنی‌دار نیست و این اثر سیر تا دو هفته پس از تجویز باقی می‌ماند اما به مرور زمان، ضعیف می‌شود.

واژگان کلیدی: سیر، نیتریک اکساید سرمی، واکنش گریس، استونیتریل، موش balb/c.

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

سیر با نام علمی Allium Sativum، گیاهی، تک‌لپه‌ای، دائمی، پیازدار از سرده Allium و متعلق به خانواده Liliaceae است. در طب سنتی ایران از سیر برای درمان بیماری‌های مختلف، مانند عفونت‌ها، سرطان‌ها، صدمات، اختلال‌های گوارشی و بیماری‌های قلبی- عروقی یادشده‌است (۱). در اغلب موارد، آثار درمانی سیر را به مواد ارگانوسولفوره سیر، مانند آلیسین و... نسبت‌می‌دهند (۲). استفاده از عصاره سیر، موجب کاهش کلسترول، تری‌گلیسرید و لیپوپروتئین‌های با دانسیته پایین می‌شود (۳)؛ همچنین گزارش‌هایی درخصوص اثر سیر در کاهش فشار خون و تحریک فعالیت فیبرینولایتیک و نیز، جلوگیری از تجمع پلاکت‌ها و انعقاد خون وجوددارند (٤). گزارش‌هایی فراوان درباره آثار ضدسرطانی سیر و ترکیب‌های جداشده از آن موجودند که براساس این گزارش‌ها، عصاره و برخی ترکیب‌های ارگانوسولفورهٔ جداشده از سیر، باعث جلوگیری از به‌وجودآمدن تومور توسط مواد مختلف کارسینوژن شده‌اند (۵)؛ تحقیق‌های مختلف از آن حکایت‌می‌کنند که سیر، پاسخ‌های ایمنی را تعدیل‌می‌کند. *غضنفری* و همکاران در مطالعات خود نشان‌داده‌اند که سیر، سبب افزایش فعالیت انفجار تنفسی ماکروفاژ صفاقی موش balb/c (که یکی از سازوکارهای آثار ضدمیکروبی و ضدسرطانی ماکروفاژهاست)، می‌شود (٦).

نیتریک اکساید، یک مولکول کوچک هیدروفوب است که از غشاهای سلولی بدون کانال یا گیرنده همانند اکسیژن مولکولی و دی‌اکسیدکربن عبورمی‌کند. هیدروفوب‌بودن نیتریک اکساید، باعث می‌شود که در غشاهای چربی، سریع‌تر انتشاریابد؛ درنتیجه، غشای سلولی، سدی برای آن محسوب‌نمی‌شود (۷)؛ نیتریک اکساید به‌طور اختصاصی از اتم‌های نیتروژن گوانیدین اسید آمینه L- آرژنین ساخته‌می‌شود (۸) و در تجمع پلاکتی و تکثیر سلول‌های عضله صاف عروقی، اثر مهاری داشته، همچنین، نقش تنظیمی هموستاتیک ژنرالیزه را در دیواره سلولی برعهده‌دارد (۹). عملکرد فیزیولوژیک شناخته‌شدهٔ نیتریک اکساید در مغز، شامل دخالت در حافظه، تنظیم جریان خون مغزی و تشکیل مایع مغزی نخاعی است (۸)؛ نیتریک اکساید، علاوه‌بر نقش‌های یادشده، طی پاسخ‌های ایمنی و التهابی نیز تولید و در ایمنی ذاتی به‌عنوان یک ماده توکسیک به‌دنبال عفونت با ارگانیسم‌های عفونی ایجادمی‌شود اما می‌تواند مرگ و عملکرد سلول‌های میزبان را القا یا تنظیم‌کند؛ بنابراین تنظیم‌کننده ایمنی اختصاصی است (۷).

اندازه‌گیری نیتریک اکساید در نمونه‌های بیولوژیکی، مستلزم دقت و توجه بسیار است. نیتریک اکساید به‌وسیله اکسیژن، به‌سرعت به نیتریت یا نیترات اکسیدمی‌شود (۱۰). تولید نیتریک اکساید را می‌توان با تعیین غلظت‌های محصولات پایانی نیتریت و نیترات تخمین‌زد. اندازه‌گیری غلظت نیترات/نیتریت یا نیترات کل و یا نیتریت کل (NOx) به‌طور معمول به‌عنوان شاخصی از تولید نیتریک اکساید استفاده‌می‌شود (۱۱).

مطالعات محققان نشان‌داده‌اند که بسیاری از آثار درمانی گیاه سیر، مانند اثر ضدآرترواسکلروزیز و ضدالتهابی با توانایی آن در افزایش سطح فیزیولوژیک نیتریک اکساید درون بدن رابطه‌دارند (۱۲)؛ همچنین با توجه به آثار متعدد سیر و اعمالی مختلف که نیتریک اکساید در بدن انجام‌می‌دهد (که به‌طور جالب توجهی در مواردی با آثار سیر همراستاست، مانند کاهش تجمع پلاکتی)، بررسی اثر سیر بر میزان نیتریک اکساید تولیدشده در شرایط درون‌تنی، لازم به‌نظرمی‌آید؛ ازاین‌رو، مطالعه حاضر، با هدف بررسی اثر عصاره سیر بر میزان نیتریک اکساید سرمی به‌وسیله سنجش متابولیت‌های آن، یعنی نیتریت و نیترات طراحی‌شد؛ در این مطالعه، غیر از بررسی اثر مستقیم سیر، عامل زمان نیز مورد ارزیابی قرارگرفت تا مشخص شود که اثر سیر در بدن تا چه مدت پایدار است؛ به همین دلیل گروه‌های دریافت‌کننده عصاره، در سه گروه بررسی «پس از ٢٤

Archive of SID

www.SID.ir

ساعت، یک هفته و دو هفته پس از آخرین تزریق» تفکیک‌شدند.

مواد و روش‌ها

برای تهیه عصاره سیر، از سیر همدان (تهیه‌شده از مزارع همدان، ایران) استفاده‌شد. در زمان تهیه سیرها از تازه‌نبودن و دست‌کم ۱ساله‌بودن آنها اطمینان حاصل‌شد. به‌منظور تهیه عصاره آبی، روش معرفی‌شدهٔ *غضنفری* و همکاران (۱۳) به‌کارگرفته‌شد. به‌طور خلاصه، سیر همدان، پس از جداکردن پوست به‌مدت یک شب در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس با ایجاد شکافی در جبه‌های سیر، با مخلوط‌کن به نسبت۱ گرم در۱ میلی‌لیتر آب مقطر استریل مخلوط‌شد؛ مخلوط حاصل، پس از صاف‌شدن (با کاغذ واتمن شماره ۱)، با دور ۱٤۰۰۰ به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی آن، جدا و به‌عنوان عصاره خام آبی سیر (crude extract) در یخچال نگهداری‌شد.

حیوان آزمایشگاهی

تعداد ۳۰ رأس موش balb/C ماده با سن حدود شش تا هشت هفته و میانگین وزنی ۲۸/۵ گرم از حیوان‌خانه دانشگاه شاهد تهیه و پس از وزن‌کردن، به‌طور تصادفی به شش گروه تقسیم‌شدند. سه گروه به‌عنوان گروه کنترل و سه گروه به‌عنوان گروه‌های دریافت‌کننده عصاره سیر، مشخص شدند. گروه‌های دریافت‌کننده عصاره در میزان غلظت دریافت عصاره، یکسان بودند ولی از نظر فاصله میان آخرین تجویز و کشتن، به سه گروه ٢٤ ساعت، یک هفته و دو هفته پس از آخرین تجویز تقسیم‌شدند. برای هر گروه دریافت‌کننده عصاره، یک گروه کنترل درنظرگرفته‌شد.

تجویز روزانه عصاره سیر

با توجه به میانگین وزنی موش‌ها، ۲۰ میلی‌گرم برکیلوگرم عصاره سیر در حجم ۲۰۰ میکرولیتر با سرم فیزیولوژی، رقیق و به-مدت یک هفته روزانه به‌صورت درون‌صفاقی تزریق‌شد. تزریق‌ها به‌طور مداوم و در ساعاتی مشخص از روز انجام‌گرفتند. موش‌های گروه کنترل به‌مدت یک هفته، سرم فیزیولوژی استریل را در حجم ۲۰۰ میکرولیتر از طریق تزریق درون‌صفاقی دریافت‌کردند.

کشتن حیوان‌ها و تهیه سرم

ابتدا موش مورد بررسی با حجم بالای دی‌اتیل‌اتر، بیهوش و پیش از ایستادن کامل قلب از تپش، به میزان ۱/۵ سی‌سی از قلب هر موش، خون گرفته و در لوله‌های جداگانه ریخته‌شد. پس از تشکیل لخته، سرم جمع‌آوری‌شده، در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد برای سنجش نیتریک اکساید نگهداری‌شد.

سنجش نیتریک اکساید

در این مطالعه، یک‌بار غلظت نیتریت اولیه هر نمونه با روش گریس و پس از تبدیل نیترات به نیتریت به‌وسیله استونیتریل، غلظت نیترات + نیتریت (نیتریت کل) با روش گریس سنجیده‌شد. برای سنجش مخلوط نیتریت اولیه نمونه، ابتدا ۵۰ میکرولیتر از سرم هر موش در میکروپلیت ۹٦ خانه ریخته‌شد؛ سپس با توجه به دستورالعمل واکنش گریس، ۵۰ میکرولیتر از محلول سولفونیل آمید (نحوهٔ تهیه: ۱ گرم از پودر سولفونیل آمید در ۱۰۰ سی‌سی اسید فسفریک۵ درصد حل‌شد که به غلظت نهایی ۱ درصد رسید) و ۵۰ میکرولیتر از محلول NEDA[1] (نحوهٔ تهیه: ۰/۱گرم از پودر NEDA در ۱۰۰ سی‌سی اسیدفسفریک ۵ درصد حل‌شد که به غلظت نهایی ۰/۱ درصد رسید) به هر چاهک اضافه شد که حجم نهایی هر چاهک به ۱۵۰ میکرولیتر رسید (١٤). برای سنجش نیترات + نیتریت، به یک احیاکننده نیترات به نیتریت نیازبود که در این آزمایش از استونیتریل استفاده‌شد؛ بدین ترتیب که ۲۵ میکرولیتر از سرم هر موش در چاهک ریخته و سپس هم‌حجم نمونه، یعنی ۲۵ میکرولیتر استونیتریل (مرک آلمان) به آن افزوده‌شد (۱۵)؛ ادامه مراحل، مانند روش گریس است. جذب

[1] -N-1-(naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride

Archive of SID
www.SID.ir

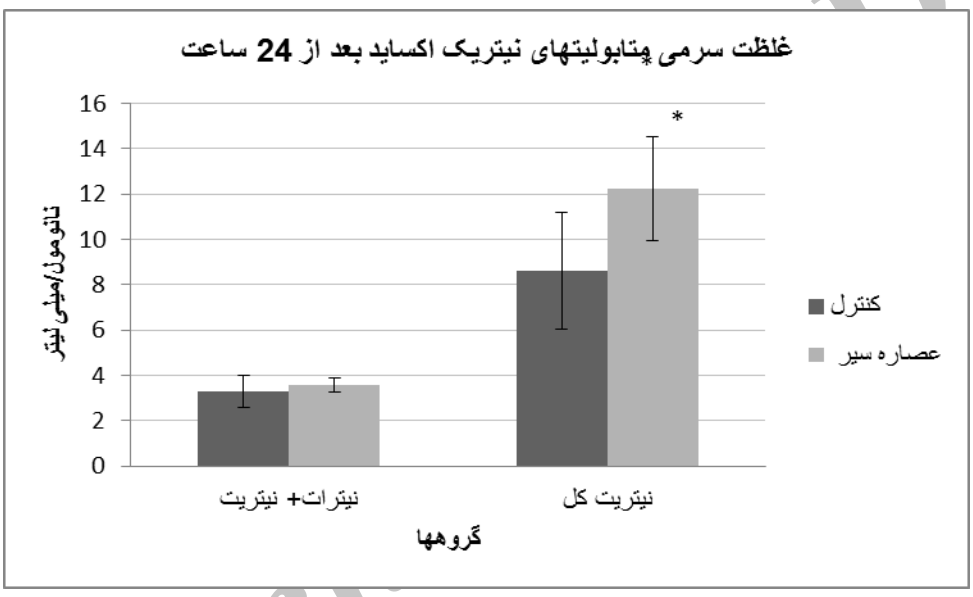
نوری ناشی از تغییر رنگ حاصل‌شده در هر چاهک، با دستگاه جذب‌سنج خوانندهٔ الایزا در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده‌شد؛ سپس توسط برنامهٔ point to point و مقادیر استانداردی که به دستگاه داده‌شد، غلظت هر چاهک با دستگاه محاسبه‌شد.

آزمون آماری

غلظت‌های به‌دست‌آمده با آزمون آماری تی-استیودنت بررسی‌شده، مقدارP کمتر از ۰/۰۵ سطح معنی‌داری درنظرگرفته‌شد.

نتایج

نتایج حاصل از سنجش نیتریک اکساید سرمی ۲۴ ساعت پس از آخرین دریافت عصاره سیر: سطح متابولیت‌های نیتریک اکساید سرم موش‌های دریافت‌کننده عصاره سیر ۲۴ ساعت پس از آخرین تزریق با روش گریس سنجیده‌شد و نتایج به‌دست‌آمده در شکل ۱ آورده‌شده‌اند.



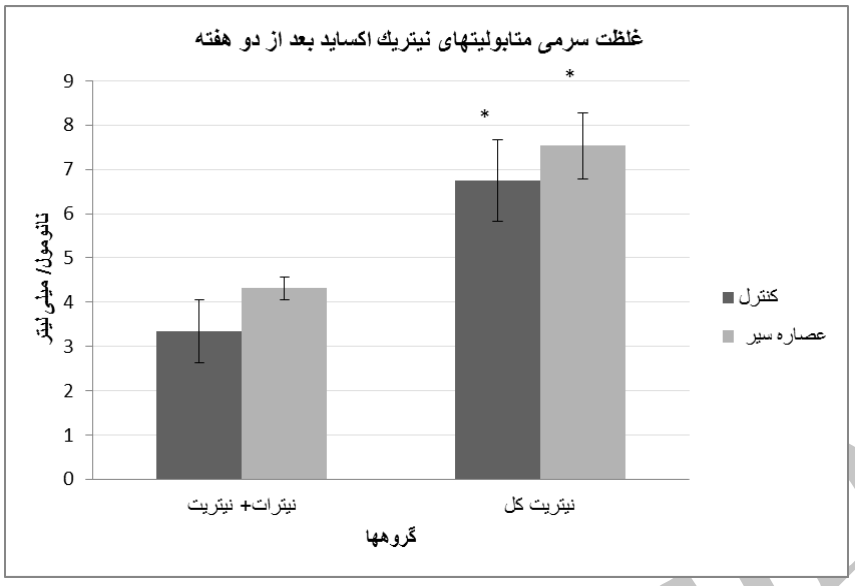
شکل۱. غلظت سرمی متابولیت‌های نیتریک اکساید (نانومول در میلی‌لیتر)، ۲۴ ساعت پس از آخرین تزریق، سنجیده‌شده با روش گریس

*= معنی‌دار با نیترات + نیتریت

مقایسه غلظت نیتریت اولیه و نیترات + نیتریت نشان‌می‌دهد که گروه دریافت‌کننده عصاره سطح نیترات + نیتریت نسبت‌به نیتریت اولیه در این گروه، اختلافی معنی‌دار دارد (P<۰/۰۲).

نتایج حاصل از سنجش نیتریک اکساید سرمی، یک هفته پس از آخرین دریافت عصاره سیر: سطح متابولیت‌های نیتریک اکساید سرم موش‌های دریافت‌کننده عصاره سیر، یک هفته پس از آخرین تزریق سنجیده‌شد و نتایج حاصل، در شکل۲ آورده‌شده‌اند.

www.SID.ir

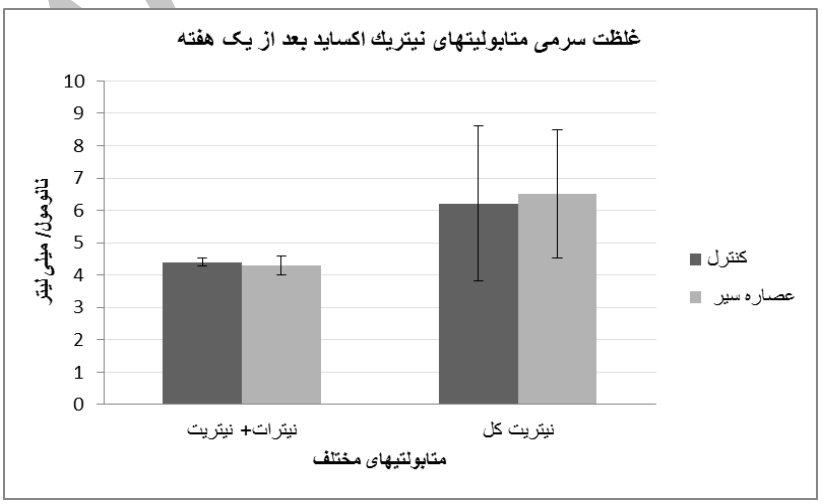


شکل ۲. غلظت متابولیت‌های نیتریک اکساید سرمی (نانومول در میلی‌لیتر)، یک هفته پس از آخرین تزریق، سنجیده‌شده با روش گریس

*= معنی‌دار با نیترات+ نیتریت

مقایسه غلظت سطح متابولیت‌های نیتریک اکساید سنجیده‌شده نشان‌می‌دهد که در هر دو گروه کنترل و عصاره، سطوح نیتریت اولیه و نیترات + نیتریت سنجیده‌شده، اختلافی معنی‌دار دارند (به‌ترتیب: P<۰/۰۳ و P<۰/۰۲)؛ ولی در هریک از متابولیت‌ها اختلافی معنی‌دار میان گروه کنترل و دریافت‌کننده عصاره وجودندارد.

نتایج حاصل از سنجش نیتریک اکساید سرمی، دو هفته پس از آخرین دریافت عصاره سیر: سطح متابولیت‌های نیتریک اکساید سرم موش‌های دریافت‌کننده عصاره سیر، دو هفته پس از آخرین تزریق سنجیده‌شد و نتایج حاصل، در شکل۳ آورده‌شده‌اند.



شکل ۳. غلظت سرمی متابولیت‌های نیتریک اکساید (نانومول در میلی‌لیتر)، دو هفته پس از آخرین تزریق، سنجیده‌شده با روش گریس

www.SID.ir

مقایسه غلظت متابولیت‌های سنجیده‌شده با روش گریس در گروه کنترل و عصاره، تفاوتی معنی‌دار را نشان‌نداده‌است.

درانتها به‌منظور جمع‌بندی نتایج، اثر عصاره سیر بر مقدار متابولیت‌های مختلف نیتریک اکساید سرمی در زمان‌های مختلف، به‌طور خلاصه در شکل٤ آورده‌شده‌اند؛ نتایج تجزیه‌وتحلیل گروه‌ها میان دو روش از لحاظ آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۰٤۱).

شکل ٤. مقایسه اثر عصاره سیر بر مقدار متابولیت‌های نیتریک اکساید سرمی در زمان‌های مختلف

بحث

با توجه به آثار متعدد سیر و اعمالی مختلف که نیتریک اکساید در بدن انجام‌می‌دهد، بررسی اثر عصاره سیر بر میزان نیتریک اکساید سرمی تولیدشده در شرایط درون‌تنی، لازم به‌نظرمی‌آید؛ ازاین‌رو، مطالعه حاضر، با هدف بررسی اثر عصاره سیر با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن موش و با تزریق روزانه درون‌صفاقی بر میزان نیتریک اکساید سرمی (به‌وسیله سنجش متابولیت‌های آن) طراحی‌شد. در این مطالعه، غیر از بررسی اثر مستقیم سیر، عامل زمان نیز مورد ارزیابی قرارگرفت تا مشخص شود که اثر سیر در بدن تا چه مدت پایدار است؛ به همین دلیل، گروه‌های دریافت‌کننده عصاره، در سه گروه بررسی پس از ٢٤ ساعت، یک هفته و دو هفته پس از آخرین تزریق، تفکیک شدند.

یافته‌های این مطالعه نشان‌می‌دهند که سطح نیترات + نیتریت و نیتریت اولیه ٢٤ ساعت پس از آخرین تجویز عصاره سیر، نسبت‌به گروه کنترل ٤٢ و ۷/۵ درصد (به‌ترتیب) افزایش‌یافته‌است؛ در گروه دوم که یک هفته پس از آخرین دریافت سیر، سطح نیتریک اکساید سنجیده‌شده‌است، عصاره سیر توانسته به‌ترتیب، سطح نیترات + نیتریت و نیتریت اولیه را ۱۲ و ۲۹ درصد افزایش‌دهد و در گروه سوم که دو هفته پس از آخرین تجویز بررسی‌شده‌اند، سطح سرمی نیتریت اولیه به میزان ۲/۵ درصد کاهش‌یافته ولی غلظت نیترات + نیتریت به میزان ٤/۸ درصد افزایش‌داشته‌است.

www.SID.ir

با توجه به آثاری که سیر از طریق تنظیم نیتریک اکساید در بدن دارد (۱۲)، مطالعاتی مختلف، اثر آن را بر نیتریک اکساید در نمونه‌ها و مدل‌های گوناگون بررسی‌کرده‌اند؛ ازآن‌جمله در مطالعه‌ای در سال ۱۳۸٤، *غضنفری* و همکاران، اثر عصاره سیر و ماده ایمونومدولاتور آن را بر میزان تولید نیتریک اکساید وIL-12 توسط ماکروفاژهای صفاقی موش‌های balb/c آلوده به لشمانیوز بررسی‌کردند؛ در این مطالعه، موش‌های آلوده به انگل با گذراندن دوره درمانی هفت روزه با عصاره سیر و ماده ایمونومدولاتور آن درمان‌شدند. ماکروفاژهای صفاقی کشت‌داده‌شد؛ نتایج سنجش نیتریک اکساید با روش گریس نشان‌دادند، ماکروفاژهای صفاقی در گروهی که عصاره سیر را دریافت‌کردند، تولید نیتریک اکساید را تا دو برابر گروه کنترل افزایش‌دادند (۱۳)؛ در مطالعه حاضر نیز، ۲٤ ساعت و یک هفته پس از آخرین تزریق سیر، میزان نیتریک اکساید سرم نسبت‌به گروه کنترل، افزایش نشان‌می‌دهد؛ هرچند این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار نیست ولی با توجه به کمتربودن میزان نیتریک اکساید در سرم نسبت‌به مایع رویی کشت سلول و دقیق‌نبودن روش گریس برای سنجش نیتریک اکساید سرم، این تفاوت پذیرفتنی و توجیه‌پذیر است.

نتایج مطالعه‌ای که *ساواش*[1] و همکاران در سال ۲۰۱۰، درخصوص اثر آنتی‌اکسیدانی روغن سیر روی موش‌های دارای صدمات کلیوی انجام‌دادند، نشانداده‌اند که میزان اوره و کراتنین خون و سطح نشانگرهای (مارکرهای) اکسیدانی سرم، مانند میئلوپروکسیداز، نیتریک اکساید و پروتئین کربونیل، به‌طور معنی‌داری در رت‌هایی که سیر دریافت‌نکرده‌اند، نسبت‌به رت‌هایی که به‌مدت شش هفته و هر هفته، سه مرتبه روغن سیر را از راه خوراکی دریافت‌کرده‌اند، بالاست (۱٦)؛ این مطالعه از جهاتی مختلف با مطالعه حاضر تفاوت‌دارد؛ ازجمله در مطالعه حاضر، عصاره آبی سیر خام و در مطالعه *ساواش*، روغن سیر استفاده‌شده‌است؛ بنابراین، تفاوت نتایج می‌تواند با نوع ماده استفاده‌شده، مرتبط باشد؛ ازطرفی در مطالعه *ساواش*، رت‌های دارای بیماری کلیوی بررسی‌شده‌اند درحالی‌که در مطالعه حاضر، موش‌های سالم مورد مطالعه قرارگرفته‌اند؛ با توجه به آثار ایمنومدولاتوری سیر، ممکن است سیر در جهت تنظیم پاسخی که در بیماری، حالت افزایشی به خود گرفته، عمل‌کرده و کاهش آن را سبب‌شده‌باشد.

در سال ۲۰۰۲ *موری‌هارا*[2] و همکاران، اثر عصاره سیر چندساله را بر تولید نیتریک اکساید مورد مطالعه قراردادند و بدین نتیجه رسیدند که تجویز عصاره سیر، به‌طور موقت، موجب افزایش سطح نیتریک اکساید پلاسمائی موش‌های دریافت‌کننده عصاره ۱۵ تا ٦۰ دقیقه پس از تجویز می‌شود (۱۲)؛ در این مطالعه، اثر زودگذر سیر بر سطح نیتریک اکساید مورد سنجش قرارگرفته‌است و با گذشت زمان، این افزایش ۳۰ تا ٤۰ درصدی مشاهده‌شده در مطالعه *موری‌هارا* کاهش‌می‌یابد؛ نتیجه‌ای که در مطالعه حاضر به‌خوبی نشان‌داده‌شده‌است.

همچنین در سال ۲۰۱۲، *پارک*[3] و همکاران، مطالعه‌ای درخصوص آثار کوتاه‌مدت عصاره سیر بر نیتریک اکساید در شرایط برون و درون‌تنی انجام‌داده‌اند؛ ایشان ماکروفاژهای رده RAW 264.7 را تحت اثر عصاره آبی سیر چندساله قرارداده، ۲ ساعت بعد، به‌مدت ۲٤ ساعت، تحت اثر LPS قراردادند؛ میزان نیتریت موجود در مایع رویین سلول‌های کشت‌داده را با روش گریس و میزان آنزیم iNOS را به‌وسیله وسترن بلات سنجیدند و مشاهده‌کردند که عصاره سیر، از اثر افزایشی LPS بر تولید نیتریک اکساید، جلوگیری‌کرده، باعث کاهش این متابولیت و همچنین موجب کاهش آنزیم iNOS شده‌است و با اندازه‌گیری مقدار و فعالیت آنزیم هم‌اکسیژناز (که در جلوگیری از تولید نیتریک اکساید القایی نقش‌دارد)، مطرح‌کرده‌اند که عصاره سیر از طریق افزایش مقدار و فعالیت این آنزیم، بر تولید نیتریک

[1] - Savas

[2]- Morihara

[3] - Park

Archive of SID

www.SID.ir

اکساید، اثر کاهشی دارد؛ ازطرفی، این مطالعه در شرایط درون‌تنی نیز با تزریق درون‌صفاقی ۱٪ عصاره سیر و تجویز داخل‌تراشه‌ای LPS ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌عنوان محرک تولید نیتریک اکساید، ۸ ساعت بعد سنجش آنزیم‌های iNOS و HO-1 در بافت ریه موش‌ها با انجام ایمنوهیستوشیمی و وسترن بلاتینگ و بررسی مقدار mRNA این آنزیم‌ها با RT-PCR نیز صورت‌گرفته که نتایج به‌طور کامل، تأییدکننده بخش برون‌تنی هستند (۱۷)؛ در این مطالعه، اثر عصاره سیر بر نیتریک اکساید در کوتاه‌مدت، به‌خوبی مورد بررسی قرارگرفته و حتی تاحدودی سازوکار عمل عصاره را نیز تعیین‌کرده‌است ولی همچنان بایداشاره‌کرد که تفاوت نتایج مطالعه حاضر با این مطالعه می‌تواند ناشی از مدت زمان بررسی اثر باشد.

اغلب مطالعات انجام‌شده، اثر زودگذر و آنی سیر را بر سطح نیتریک اکساید سنجیده‌اند وکمتر مطالعه‌ای، آثار بلندمدت سیر بر سطح این متابولیت را مورد بررسی قرارداده‌است. با توجه به آثاری که سیر بر سیستم قلبی-عروقی دارد، نیاز تعیین ماندگاری اثر سیر در بدن و لزوم مشخص‌کردن اثر درازمدت سیر بر سطح نیتریک اکساید، به‌خوبی روشن است.

در مطالعه‌ای دیگر (۲۰۰۲)، *شوارتز*[1] و همکاران، میزان تولید نیتریک اکساید را در سلول‌های ماهیچه قلب رت تحت تأثیر غلظت‌های مختلف آلیسین سیر بررسی‌کردند؛ ایشان دریافتند که آلیسین (ترکیب مؤثر در بوی سیر) در غلظت‌های پایین (۱۰ میکرومولار) از تولید نیتریک اکساید تحت القای LPS در سلول‌های کشت‌داده‌شده ماهیچه قلب جلوگیری‌می‌کند ولی این اثر در غلظت‌های بالای آلیسین (۴۰ میکرومولار) مشاهده‌نمی‌شود؛ همچنین، ایشان مطرح‌می‌کنند که این اثر آلیسین از طریق دو سازوکار کاهش سطح بیان iNOS mRNA و ممانعت از حمل آرژنین انجام‌می‌شود (۱۸)؛ نتایج این مطالعه به‌ظاهر با نتایج حاصل مغایرت‌دارد ولی با کمی تأمل در مطالعه *شوارتز* و سایر مطالعات می‌توان‌بیان‌کرد که سطح بیان iNOS وابسته به حضور آرژنین، تنها سوبسترای فیزیولوژیک ساخت نیتریک اکساید است (۱۹) و ازطرفی، نتایج ایشان نشان‌می‌دهند که آلیسین در غلظت‌های پایین از حمل آرژنین جلوگیری‌می‌کند ولی در غلظت‌های بالا این حمل‌ونقل را افزایش‌می‌دهد؛ درنتیجه در غلظت‌های بالا با افزایش حضور آرژنین، بیان iNOS افزایش‌می‌یابد که خنثی‌کننده اثر کاهندگی آلیسین (در غلظت پایین) بر کاهش نیتریک اکساید است [و همچنین نشان‌می‌دهند که] سایر خصوصیات آلیسین مسئول این اثر دوگانه بر تولید نیتریک اکساید می‌دانند. به‌طور کامل، واضح است که آلیسین، یکی از ترکیب‌های موجود در عصاره سیر است و با توجه به مطالعه مورد بحث، تغییرهای غلظت آن بر تولید نیتریک اکساید، بسیار اثرگذارند و در عصاره سیر، غلظت تام آلیسین، به‌طور کامل، مشخص نیست و ازطرفی، ممکن است سایر ترکیب‌های موجود در عصاره در جهت تقویت یا تضعیف اثر آلیسین تنها مؤثر باشند؛ همچنین، غلظت‌های مختلف استفاده‌شدهٔ ۱۰ تا ۴۰ میکرومولار آلیسین در مقایسه با ۲۰ میلی‌گرم برکیلوگرم عصاره سیر در دو شرایط متفاوت in vivo و in Vitro، به‌طور قطع در نتایج حاصل تأثیرگذارند.

با توجه به مطالب بالا درخصوص اندازه‌گیری میزان نیتریک اکساید، بیان دو نکته، ضروری می‌نماید: ۱. نوع نمونه مورد سنجش، در نتیجه نهایی، اثرگذار است. در کشت سلول شرایط به‌طور کامل، تحت کنترل آزمایشگر بوده، به‌شدت بهینه شده‌اند و نتایج حاصل نیز، بسیار منسجم و نزدیک به هم هستند ولی در درون بدن، عواملی مختلف به‌غیراز عامل اثردهنده ما می‌توانند بر میزان آن نشانگر (مولکول مورد مطالعه) اثربگذارند و نتایج به‌دست‌آمده، ممکن است پراکندگی زیادی داشته‌باشند ولی ازآنجاکه سرم به‌طور مستقیم از فرد (حیوان یا انسان) به‌دست‌می‌آید و مارکر مورد نظر بدون کوچک‌ترین دستکاری در نمونه، سنجشمی‌شود، نتیجه حاصل، بازتابی بهتر از اثر عامل مورد آزمایش، به‌طور مثال سیر بر مارکر مورد بررسی (در این مطالعه نیتریک

[1] - Schwartz

www.SID.ir

اکساید) را در شرایط طبیعی بدن فرد نشان‌می‌دهد و ۲. نوع روش سنجش است؛ بایدتوجه‌داشت که به دلیل کوتاه‌بودن نیمه عمر نیتریک اکساید، اندازه‌گیری آن به‌نسبت، مشکل است لذا اندازه‌گیری آن با استفاده از متابولیت‌های پایدارش، یعنی نیتریت و نیترات صورت‌می‌گیرد؛ این سنجش، تخمینی قابل‌اطمینان از برون‌ده نیتریک اکساید در محیط درون‌تنی فراهم‌می‌آورد (۲۰). همبستگی بالایی میان تولید نیتریک اکساید درون‌زا و سطوح نیتریت یا نیترات (NOx) در سرم، پلاسما و ادرار گزارش‌شده‌است (۲۱). ساده‌ترین روش، رنگ‌سنجی برمبنای واکنش گریس است که در این روش، میزان نیتریت سنجش‌می‌شود (۲۰)؛ درنتیجه، استفاده از روش‌هایی که نیتریت و نیترات را با هم بسنجند، مناسب‌تر خواهدبود که در این مطالعه از روشی دیگر (افزودن استونیتریل) برای تبدیل نیترات به نیتریت و سنجش مجموعه نیترات + نیتریت نیز استفاده‌شد.

همچنین با اینکه روش گریس، روشی استاندارد و رایج در سنجش نیتریک اکساید است، در نمونه سرمی به دلیل تداخل پروتئین‌های موجود در سرم با معرف‌های واکنش، مرحله پروتئین‌زدایی، ضروری است (۲۲) و با توجه به نتایج مطالعات مختلف (۲۳،۲٤)، در مطالعه حاضر از استونیتریل به‌منظور پروتئین‌زدایی استفاده‌شد. نتایج آزمایش ما نشان‌می‌دهند که در روش گریس به‌تنهایی، حجمی بالا از نیتریک اکساید موجود در نمونه سرمی قابل‌تشخیص و سنجش نیست و با توجه به نقش استونیتریل، هم به‌عنوان احیاکننده نیترات به نیتریت و هم به‌عنوان رسوب‌دهنده پروتئین موجود در سرم، میتوان‌ادعاکرد که روش گریس همراه با استونیتریل، روشی مناسب‌تر و قابل‌استنادتر برای سنجش نیتریک اکساید در سرم است.

به‌طور کلی، یافته‌های این مطالعه نشان‌می‌دهند که عصاره سیر در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، تأثیری چشمگیر بر سطح متابولیت‌های نیتریک اکساید سرم نمی‌گذارد و افزایش ناچیز این متابولیت‌ها تحت اثر عصاره سیر با گذشت زمان کاهش می‌یابد و در دو هفته پس از تجویز، افزایشی مختصر مشاهده‌می‌شود؛ در انتها، بررسی اثر عصاره و فراکشن مؤثر سیر بر نیتریک اکساید در سطح مولکولی و مطالعه مسیر و سازوکار این اثر در شرایط برون و درون‌تنی پیشنهادمی‌شود.

منابع

1. Ghazanfari T, Yaraee R, Asoode A, Kardar M, Rajabian T. Purification of immunomodulator fraction components of garlic (R10) by HPLC method. Tehran: shahed university; 1386;1-10.
2. Ghazanfari T, Hassan Z, Ebtekar M, Ahmadiani A, Naderi G, Azar A. Garlic Induced ashift incytokin Pathern in L.major infected Balb/c mice. Scand J of Immunel. 2000;52:491-5.
3. Ismail M, Gad M, Harndy M. Study of the hypolipidernic properties of pectin. garlic and ginseng in hypercholesterolemic rabbits. Pharmacol Res. 1999;3:66-157.
4. Lim H, Kubota K, Kobayashi A, Seki T, Ariga T. Inhibitory effect of sulfur-containing compounds in Scorodocarpus borneensis Becc. on the aggregation of rabbit platelets. Biosci Biotechnol Biochem. 1999;63(2):298-301.
5. Gao C, Takezaki T, Ding H, Li M, Tajima K. Protective effect of. allium vegetables against both esophageal and stomach cancer: a simultaneous case-referent study of a high-epidemic area in Jiangsu Province. China Jpn J Cancer Res. 1999;90(6):614-21.
6. Lau B, Yamasaki T, Gridley D. Garlic compounds modulate macrophage and T Lymphocyte functions. Mol Biother. 1991;3:103-7.
7. PACHER P, BECKMAN JS, LIAUDET L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. Physiol Rev. 2007;87(1):315-424.
8. Moncada S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. J R Soc Med. 1999;92(4):164-9.
9. Moncada S, Palmer RJM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev. 1991;43:373-6.
10. Feldman PL, Griffith OW, Stuehr DJ. The surprising life of nitric oxide. C&EN. 1993:26-38.
11. Khalid R. Garlic and agin: new insights into and old remedy. Aging Research Reviews. 2003;3:39-56.
12. Morihara N, Sumioka I, Moriguchi T, Uda N, Kyo E. Aged garlic extract enhances production of nitric oxide Life Sciences. 2002; 71(5):509-17.
13. Ghazanfari T, Hassan Z, Khamesipour A. Enhancement of peritoneal macrophage phagocytic activity against Leishmania major by garlic (Allium sativum) treatment. J Ethnopharmacol. 2006;103(3):333-7.
14. Hyo-Jin A, Jae-Young U ,Ho-Jeong N, Sejin J, Hyung-Min K, Seung-Heon H. Activation of inducible nitric oxide synthase by Kagamjuaguem in peritoneal macrophage in mice. Indian J Med Res. 2007;125:740-6.

Archive of SID
www.SID.ir

15. Ghasemi A, Hedayati S, Biabani H. Protein precipitation methods evaluated for detemination of serum nitric oxide end products by the griess assay. Journal of medical sciences research. 2007;2:29-32.
16. Savas M, Yeni E, Ciftci H, Yildiz F, Gulum M, Keser B, et al. The antioxidant role of oral administration of garlic oil on renal ischemia-reperfusion injury. Ren Fail. 2010;32(3):362-7.
17. Park HJ, Jeon BT, Kim HC, Roh GS, Shin JH, Sung NJ, et al. Aged red garlic extract reduces lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and acute pulmonary inflammation through haeme oxygenase-1 induction. Acta physiologica (Oxford, England). 2012;205(1):61-70.
18. Schwartz I, Hershkovitz R, Iaina A, Gnessin E, Wollman Y, Chernichowski T, et al. Garlic attenuates nitric oxide production in rat cardiac myocytes through inhibition of inducible nitric oxide synthase and the arginine transporter CAT-2 (cationic amino acid transporter-2). Clin Sci (Lond). 2002;102(5):487-93.
19. Nicholson B, Manner CK, Kleeman J ,MacLeod CJ. Sustained nitric oxide production in macrophages requires the arginine transporter CAT-2. J Biol Chem. 2001;276:15881-5.
20. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. Nitric Oxide. 2001;5:62-71.
21. Granger DL, Taintor RR, Boockvar KS, Hibbs JB. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. Methods Enzymol. 1996;268:142-51.
22. 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.
23. Ghasemi A, Hedayati S, Biabani H, Khoushbaten A, Asgari AR. Comparing deproteinization methods for serum nitric oxide assay by greiss reaction. Pajouhesh dar pezeshki. 2007;1(31):33-7.
24. Guevara I, Iwanejko J, Dembinska-Kiec A, Pankiewicz J, Wanat A, Anna P. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by simple Griess reaction. Clin Chim Acta. 1998;274:177-88.

Archive of SID

www.SID.ir