

بررسی اثر عصاره آبی سیر بر میزان نیتریک اکساید سرمی موش

نویسندگان: سکینه مؤنذمحسنی^۱، حمیده روحانی^۲، مرضیه اقتداردوست^۳، سید محمدرضا عمادی^۴، مهرداد روغنی^۵ 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
۴. 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

E-mail: tghazanfari@yahoo.com

* نویسنده مسئول: طوبی غضنفری

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 تولید می‌شود. با توجه به اثرهای متعدد سیر و اعمالی مختلف که نیتریک اکساید در بدن انجام می‌دهد، بر آن شدیم تا در این مطالعه، اثر عصاره سیر را بر سطح سرمی متابولیت‌های نیتریک اکساید (نیترات و نیتريت) موش‌های balb/c بسنجیم.

مواد و روش‌ها: ۳۰ سر موش balb/c ماده شش تا هشت هفته به‌طور تصادفی به شش گروه تقسیم شدند: سه گروه، موش‌های گروه‌های دارو که روزانه، ۲۰ میلی‌گرم برکیلوگرم عصاره سیر [دریافت می‌کردند 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 کشته شدند. پس از تهیه سرم، میزان نیتريت و نیترات هر سرم با روش گریس سنجیده و نتایج به‌دست‌آمده با آزمون آماری تی - استیودنت بررسی شدند.

نتایج: سطح نیتريت اولیه سرمی، ۲۴ ساعت و یک هفته پس از آخرین تجویز عصاره سیر ۷/۵ و ۲۹ درصد و سطح نیترات + نیتريت ۴۲ و ۱۲ درصد، نسبت به گروه کنترل افزایش یافته‌است. دو هفته پس از آخرین تجویز نسبت به گروه کنترل نیتريت اولیه ۲/۵ درصد کاهش ولی سطح نیترات + نیتريت به میزان ۴/۸ درصد افزایش یافته‌است. هیچ یک از اختلاف‌های مشاهده شده 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، استونیتريت، موش balb/c.

دوماهنامه علمی - پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست و دوم - شماره ۱۱۵
اسفند ۱۳۹۳

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

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 یاد شده است (۱). در اغلب موارد، آثار درمانی سیر را به مواد ارگانوسولفور سیر، مانند آلیسین و... نسبت می‌دهند (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 فیبرینولیتیک و نیز، جلوگیری از تجمع پلاکت‌ها و انعقاد خون وجود دارند (۴). گزارش‌هایی فراوان درباره آثار ضدسرطانی سیر و ترکیب‌های جدا شده از آن موجودند که براساس این گزارش‌ها، عصاره و برخی ترکیب‌های ارگانوسولفور جدا شده از سیر، باعث جلوگیری از به‌وجود آمدن تومور توسط مواد مختلف کارسینوژن شده‌اند (۵)؛ تحقیق‌های مختلف از آن حکایت می‌کنند که سیر، پاسخ‌های ایمنی را تعدیل می‌کند. غضنفری و همکاران در مطالعات خود نشان داده‌اند که سیر، سبب افزایش فعالیت انفجار تنفسی ماکروفاژ صفاقی موش *balb/c* (که یکی از سازوکارهای آثار ضد میکروبی و ضدسرطانی ماکروفاژهاست)، می‌شود (۶).

نیتریک اکساید، یک مولکول کوچک هیدروفوب است که از غشاهای سلولی بدون کانال یا گیرنده همانند اکسیژن مولکولی و دی‌اکسیدکربن عبور می‌کند. هیدروفوب بودن نیتریک اکساید، باعث می‌شود که در غشاهای چربی، سریع‌تر انتشار یابد؛ در نتیجه، غشای سلولی، سدی برای آن محسوب نمی‌شود (۷)؛ نیتریک اکساید به‌طور اختصاصی از اتم‌های نیتروژن گوانیدین اسید آمینه L- آرژنین ساخته می‌شود (۸) و در تجمع پلاکتی و تکثیر سلول‌های عضله صاف عروقی، اثر مهاری داشته، همچنین، نقش تنظیمی هموستاتیک

ژنرالیزه را در دیواره سلولی برعهده دارد (۹). عملکرد فیزیولوژیک شناخته‌شده نیتریک اکساید در مغز، شامل دخالت در حافظه، تنظیم جریان خون مغزی و تشکیل مایع مغزی نخاعی است (۸)؛ نیتریک اکساید، علاوه بر نقش‌های یاد شده، طی پاسخ‌های ایمنی و التهابی نیز تولید و در ایمنی ذاتی به‌عنوان یک ماده توکسیک به‌دنبال عفونت با ارگاناسم‌های عفونی ایجاد می‌شود اما می‌تواند مرگ و عملکرد سلول‌های میزبان را القا یا تنظیم کند؛ بنابراین تنظیم‌کننده ایمنی اختصاصی است (۷).

اندازه‌گیری نیتریک اکساید در نمونه‌های بیولوژیکی، مستلزم دقت و توجه بسیار است. نیتریک اکساید به‌وسیله اکسیژن، به‌سرعت به نیتريت یا نترات اکسیدی می‌شود (۱۰). تولید نیتریک اکساید را می‌توان با تعیین غلظت‌های محصولات پایانی نیتريت و نترات تخمین زد. اندازه‌گیری غلظت نترات/نیتريت یا نترات کل و یا نیتريت کل (NOx) به‌طور معمول به‌عنوان شاخصی از تولید نیتریک اکساید استفاده می‌شود (۱۱).

مطالعات محققان نشان داده‌اند که بسیاری از آثار درمانی گیاه سیر، مانند اثر ضدآرترواسکلروزیز و ضدالتهابی با توانایی آن در افزایش سطح فیزیولوژیک نیتریک اکساید درون بدن رابطه دارند (۱۲)؛ همچنین با توجه به آثار متعدد سیر و اعمالی مختلف که نیتریک اکساید در بدن انجام می‌دهد (که به‌طور جالب توجهی در مواردی با آثار سیر همراستاست، مانند کاهش تجمع پلاکتی)، بررسی اثر سیر بر میزان نیتریک اکساید تولید شده در شرایط درون‌تنی، لازم به‌نظر می‌آید؛ از این‌رو، مطالعه حاضر، با هدف بررسی اثر عصاره سیر بر میزان نیتریک اکساید سرمی به‌وسیله سنجش متابولیت‌های آن، یعنی نیتريت و نترات طراحی شد؛ در این مطالعه، غیر از بررسی اثر مستقیم سیر، عامل زمان نیز مورد ارزیابی قرار گرفت 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 ۲۴

ساعاتی مشخص از روز انجام گرفتند. موش‌های گروه کنترل به مدت یک هفته، سرم فیزیولوژی استریل را در حجم ۲۰۰ میکرولیتر از طریق تزریق درون صفاقی دریافت کردند.

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 ریخته شد. پس از تشکیل لخته، سرم جمع‌آوری شده، در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد برای سنجش نیتریک اکساید نگهداری شد.

سنجش نیتریک اکساید

در این مطالعه، یک‌بار غلظت نیتريت اولیه هر نمونه با روش گریس و پس از تبدیل نیترات به نیتريت به وسیله استونیتریل، غلظت نیترات + نیتريت (نیتريت کل) با روش گریس سنجیده شد. برای سنجش مخلوط نیتريت اولیه نمونه، ابتدا ۵۰ میکرولیتر از سرم هر موش در میکروپلیت ۹۶ خانه ریخته شد؛ سپس با توجه به دستورالعمل واکنش گریس، ۵۰ میکرولیتر از محلول سولفونیل آمید (نحوه تهیه: ۱ گرم از پودر سولفونیل آمید در ۱۰۰ سی‌سی اسید فسفریک ۵ درصد حل شد که به غلظت نهایی ۱ درصد رسید) و ۵۰ میکرولیتر از محلول^۱ NEDA (نحوه تهیه: ۰/۱ گرم از پودر NEDA در ۱۰۰ سی‌سی اسید فسفریک ۵ درصد حل شد که به غلظت نهایی ۰/۱ درصد رسید) به هر چاهک اضافه شد که حجم نهایی هر چاهک به ۱۵۰ میکرولیتر رسید (۱۴). برای سنجش نیترات + نیتريت، به یک احیاکننده نیترات به نیتريت نیاز بود که در این آزمایش از استونیتریل استفاده شد؛ بدین ترتیب که ۲۵ میکرولیتر از سرم هر موش در چاهک ریخته و سپس هم‌حجم نمونه، یعنی ۲۵ میکرولیتر استونیتریل (مرک آلمان) به آن افزوده شد (۱۵)؛ ادامه مراحل، مانند روش گریس است. جذب

ساعت، یک هفته و دو هفته پس از آخرین تزریق تفکیک شدند.

مواد و روش‌ها

برای تهیه عصاره سیر، از سیر همدان (تهیه شده از مزارع همدان، ایران) استفاده شد. در زمان تهیه سیرها از تازه‌بودن و دست‌کم ۱ ساله بودن آنها اطمینان حاصل شد. به منظور تهیه عصاره آبی، روش معرفی شده غصنفری و همکاران (۱۳) به کار گرفته شد. به طور خلاصه، سیر همدان، پس از جدا کردن پوست به مدت یک شب در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس با ایجاد شکافی در جبهه‌های سیر، با مخلوط‌کن به نسبت ۱ گرم در ۱ میلی‌لیتر آب مقطر استریل مخلوط شد؛ مخلوط حاصل، پس از صاف شدن (با کاغذ واتمن شماره ۱)، با دور ۱۴۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی آن، جدا و به عنوان عصاره خام آبی سیر (crude extract) در یخچال نگهداری شد.

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 وزن کردن، به طور تصادفی به شش گروه تقسیم شدند. سه گروه به عنوان گروه کنترل و سه گروه به عنوان 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 ۲۴ ساعت، یک هفته و دو هفته پس از آخرین تجویز تقسیم شدند. برای هر گروه دریافت‌کننده عصاره، یک گروه کنترل در نظر گرفته شد.

تجویز روزانه عصاره سیر

با توجه به میانگین وزنی موش‌ها، ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره سیر در حجم ۲۰۰ میکرولیتر با سرم فیزیولوژی، رقیق و به مدت یک هفته روزانه به صورت درون صفاقی تزریق شد. تزریق‌ها به طور مداوم و در

^۱ 1-N-1-(naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride

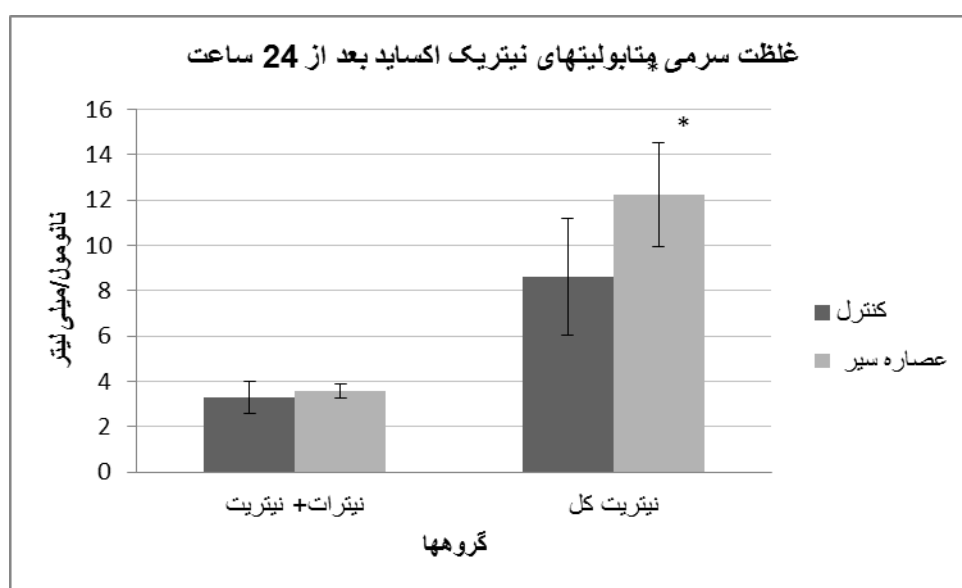
نتایج

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.

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

آزمون آماری

غلظت‌های به‌دست‌آمده با آزمون آماری تی-استیودنت بررسی‌شده، مقدار P کمتر از ۰/۰۵ سطح معنی‌داری در نظر گرفته‌شد.

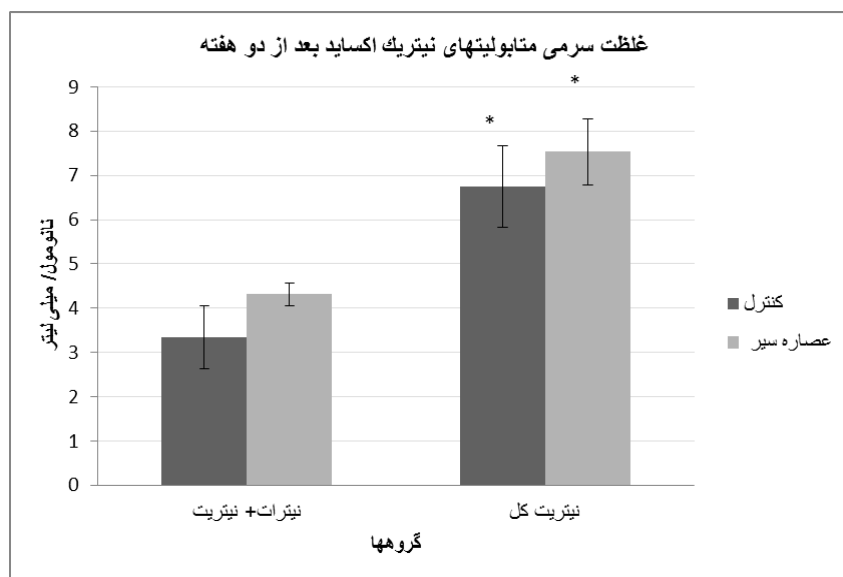


شکل ۱. غلظت سرمی متابولیت‌های نیتریک اکساید (نانومول در میلی‌لیتر)، ۲۴ ساعت پس از آخرین تزریق، سنجیده‌شده با روش گریس

* = معنی‌دار با نیترات + نیتريت

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 شکل ۲ آورده‌شده‌اند.

مقایسه غلظت نیتريت اولیه و نیترات + نیتريت نشان‌می‌دهد که گروه دریافت‌کننده عصاره سطح نیترات + نیتريت نسبت به نیتريت اولیه در این گروه، اختلافی معنی‌دار دارد ($P < 0/02$). نتایج حاصل از سنجش نیتریک اکساید سرمی، یک



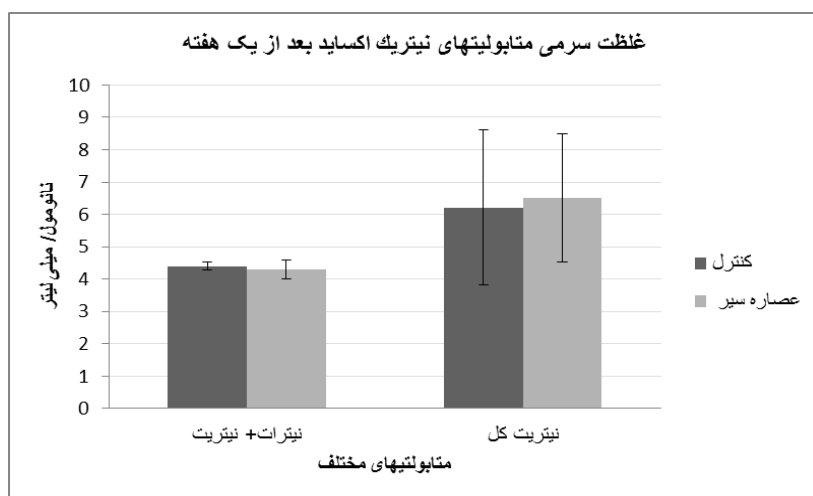
شکل ۲. غلظت متابولیت‌های نیتریک اکساید سرمی (نانومول در میلی‌لیتر)، یک هفته پس از آخرین تزریق، سنجیده‌شده با روش گریس

* = معنی دار با نیترات + نیتريت

وجود ندارد.

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 شکل ۳ آورده شده‌اند.

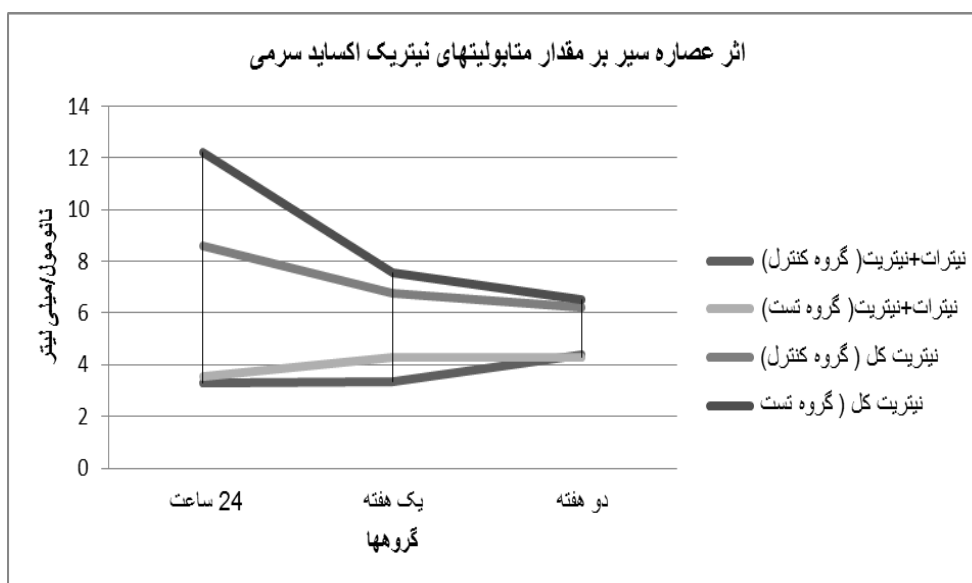
مقایسه غلظت سطح متابولیت‌های نیتریک اکساید سنجیده‌شده نشان می‌دهد که در هر دو گروه کنترل و عصاره، سطوح نیتريت اولیه و نیترات + نیتريت سنجیده‌شده، اختلافی معنی‌دار دارند (به ترتیب: $P < 0.03$ و $P < 0.02$)؛ ولی در هر یک از متابولیت‌ها اختلافی معنی‌دار میان گروه کنترل و دریافت‌کننده عصاره



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

زمان‌های مختلف، به‌طور خلاصه در شکل ۴ آورده شده‌اند؛ نتایج تجزیه و تحلیل گروه‌ها میان دو روش از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P < 0/00041$).

مقایسه غلظت متابولیت‌های سنجد شده با روش گریس در گروه کنترل و عصاره، تفاوتی معنی‌دار را نشان نداده است. در انتها به‌منظور جمع‌بندی نتایج، اثر عصاره سیر بر مقدار متابولیت‌های مختلف نیتریک اکساید سرمی در



شکل ۴. 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 انجام می‌دهد، بررسی اثر عصاره سیر بر میزان نیتریک اکساید سرمی تولید شده در شرایط درون‌تنی، لازم به‌نظر می‌آید؛ از این رو، مطالعه حاضر، با هدف بررسی اثر عصاره سیر با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن موش و با تزریق روزانه درون‌صفافی بر میزان نیتریک اکساید سرمی (به‌وسیله سنجد متابولیت‌های آن) طراحی شد. در این مطالعه، غیر از بررسی اثر مستقیم سیر، عامل زمان نیز مورد ارزیابی قرار گرفت 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 ۲۴ ساعت، یک هفته و دو هفته پس از آخرین تزریق،

تفکیک شدند.

یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهند که سطح نیترات + نیتريت و نیتريت اولیه ۲۴ ساعت پس از آخرین تجویز عصاره سیر، نسبت به گروه کنترل ۴۲ و ۷/۵ درصد (به ترتیب) افزایش یافته است؛ در گروه دوم که یک هفته پس از آخرین دریافت سیر، سطح نیتریک اکساید سنجد شده است، عصاره سیر توانسته به ترتیب، سطح نیترات + نیتريت و نیتريت اولیه را ۱۲ و ۲۹ درصد افزایش دهد و در گروه سوم که دو هفته پس از آخرین تجویز بررسی شده‌اند، سطح سرمی نیتريت اولیه به میزان ۲/۵ درصد کاهش یافته ولی غلظت نیترات + نیتريت به میزان ۴/۸ درصد افزایش داشته است.

نتایج می‌تواند با نوع ماده استفاده‌شده، مرتبط باشد؛ ازطرفی در مطالعه ساوش^۱، رت‌های دارای بیماری کلیوی بررسی‌شده‌اند درحالی‌که در مطالعه حاضر، موش‌های سالم مورد مطالعه قرار گرفته‌اند؛ با توجه به آثار ایمنومدولاتوری سیر، ممکن است سیر در جهت تنظیم پاسخی که در بیماری، حالت افزایشی به خود گرفته، عمل کرده و کاهش آن را سبب‌شده‌باشد.

در سال ۲۰۰۲ موری‌هارا^۲ و همکاران، اثر عصاره سیر چندساله را بر تولید نیتریک اکساید مورد مطالعه قرار دادند و بدین نتیجه رسیدند که تجویز عصاره سیر، به‌طور موقت، موجب افزایش سطح نیتریک اکساید پلاسمائی موش‌های دریافت‌کننده عصاره ۱۵ تا ۶۰ دقیقه پس از تجویز می‌شود (۱۲)؛ در این مطالعه، اثر زودگذر سیر بر سطح نیتریک اکساید مورد سنجش قرار گرفته‌است و با گذشت زمان، این افزایش ۳۰ تا ۴۰ درصدی مشاهده‌شده در مطالعه موری‌هارا کاهش می‌یابد؛ نتیجه‌ای که در مطالعه حاضر به‌خوبی نشان‌داده‌شده‌است.

همچنین در سال ۲۰۱۲، پارک^۳ 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 قرار داده، ۲ ساعت بعد، به‌مدت ۲۴ ساعت، تحت اثر LPS قرار دادند؛ میزان نیتريت موجود در مایع روئین 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، جلوگیری کرده، 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 نقش دارد)، مطرح کرده‌اند که عصاره سیر از طریق افزایش مقدار و فعالیت این آنزیم، بر تولید نیتریک

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 بررسی کرده‌اند؛ از آن‌جمله در مطالعه‌ای در سال ۱۳۸۴، غضنفری و همکاران، اثر عصاره سیر و ماده ایمنومدولاتور آن را بر میزان تولید نیتریک اکساید و IL-12 توسط ماکروفاژهای صفاقی موش‌های balb/c آلوده به لشمانيوز بررسی کردند؛ در این مطالعه، موش‌های آلوده به انگل با گذراندن دوره درمانی هفت روزه با عصاره سیر و ماده ایمنومدولاتور آن درمان شدند. ماکروفاژهای صفاقی کشت‌داده‌شد؛ نتایج سنجش نیتریک اکساید با روش گریس نشان‌دادند، ماکروفاژهای صفاقی در گروهی که عصاره سیر را دریافت کردند، تولید نیتریک اکساید را تا دو برابر گروه کنترل افزایش دادند (۱۳)؛ در مطالعه حاضر نیز، ۲۴ ساعت و یک هفته پس از آخرین تزریق سیر، میزان نیتریک اکساید سرم نسبت به گروه کنترل، افزایش نشان می‌دهد؛ هرچند این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار نیست ولی با توجه به کم‌تر بودن میزان نیتریک اکساید در سرم نسبت به مایع روئین کشت سلول و دقیق‌نبودن روش گریس برای سنجش نیتریک اکساید سرم، این تفاوت پذیرفتنی و توجیه‌پذیر است.

نتایج مطالعه‌ای که ساوش^۱ و همکاران در سال ۲۰۱۰، درخصوص اثر آنتی‌اکسیدانی روغن سیر روی موش‌های دارای صدمات کلیوی انجام‌دادند، نشان‌داده‌اند که میزان اوره و کراتینین خون و سطح نشانگرهای (مارکرهای) اکسیدانی سرم، مانند میتلوپروکسیداز، نیتریک اکساید و پروتئین کربونیل، به‌طور معنی‌داری در رت‌هایی که سیر دریافت‌نکرده‌اند، نسبت به رت‌هایی که به‌مدت شش هفته و هر هفته، سه مرتبه روغن سیر را از راه خوراکی دریافت کرده‌اند، بالاست (۱۶)؛ این مطالعه از جهاتی مختلف با مطالعه حاضر تفاوت دارد؛ ازجمله در مطالعه حاضر، عصاره آبی سیر خام و در مطالعه ساوش^۱، روغن سیر استفاده‌شده‌است؛ بنابراین، تفاوت

² - Morihara

³ - Park

¹ - Savas

اکساید، اثر کاهشی دارد؛ از طرفی، این مطالعه در شرایط درون تنی نیز با تزریق درون صفاقی ۱٪ عصاره سیر و تجویز داخل تراشه‌ای 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 بلائینگ و بررسی مقدار mRNA این آنزیم‌ها با RT-PCR نیز صورت گرفته که نتایج به‌طور کامل، تأییدکننده بخش برون تنی هستند (۱۷)؛ در این مطالعه، اثر عصاره سیر بر نیتریک اکساید در کوتاه‌مدت، به‌خوبی مورد بررسی قرار گرفته و حتی تا حدودی سازوکار عمل عصاره را نیز تعیین کرده‌است ولی همچنان باید اشاره کرد 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 و کمتر مطالعه‌ای، آثار بلندمدت سیر بر سطح این متابولیت را مورد بررسی قرار داده‌است. با توجه به آثاری که سیر بر سیستم قلبی-عروقی دارد، نیاز تعیین ماندگاری اثر سیر در بدن و لزوم مشخص کردن اثر درازمدت سیر بر سطح نیتریک اکساید، به‌خوبی روشن است.

در مطالعه‌ای دیگر (۲۰۰۲)، شورترز^۱ و همکاران، میزان تولید نیتریک اکساید را در سلول‌های ماهیچه قلب رت تحت تأثیر غلظت‌های مختلف آلیسین سیر بررسی کردند؛ 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 جلوگیری کند ولی این اثر در غلظت‌های بالای آلیسین (۴۰ میکرومولار) مشاهده نمی‌شود؛ همچنین، ایشان مطرح می‌کنند که این اثر آلیسین از طریق دو سازوکار کاهش سطح بیان mRNA iNOS و ممانعت از حمل آرژنین انجام می‌شود (۱۸)؛ نتایج این مطالعه به‌ظاهر با نتایج حاصل مغایرت دارد ولی با کمی تأمل در مطالعه شورترز

و سایر مطالعات می‌توان بیان کرد که سطح بیان iNOS وابسته به حضور آرژنین، تنها سوبسترای فیزیولوژیک ساخت نیتریک اکساید است (۱۹) و از طرفی، نتایج ایشان نشان می‌دهند که آلیسین در غلظت‌های پایین از حمل آرژنین جلوگیری می‌کند ولی در غلظت‌های بالا این حمل و نقل را افزایش می‌دهد؛ در نتیجه در غلظت‌های بالا با افزایش حضور آرژنین، بیان iNOS افزایش می‌یابد که خنثی‌کننده اثر کاهندگی آلیسین (در غلظت پایین) بر کاهش نیتریک اکساید است [و همچنین نشان می‌دهند 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 از طرفی، ممکن است سایر ترکیب‌های موجود در عصاره در جهت تقویت یا تضعیف اثر آلیسین تنها مؤثر باشند؛ همچنین، غلظت‌های مختلف استفاده‌شده ۱۰ تا ۴۰ میکرومولار آلیسین در مقایسه با ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره سیر در دو شرایط متفاوت *in vivo* و *in Vitro*، به‌طور قطع در نتایج حاصل تأثیر گذارند.

با توجه به مطالب بالا در خصوص 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 به‌غیر از عامل اثردهنده ما می‌توانند بر میزان آن نشانگر (مولکول مورد مطالعه) اثر بگذارند و نتایج به‌دست‌آمده، ممکن است پراکندگی زیادی داشته باشند ولی از آنجاکه سرم به‌طور مستقیم از فرد (حیوان یا انسان) به‌دست می‌آید و مارکر مورد نظر بدون کوچک‌ترین دستکاری در نمونه، سنجش می‌شود، نتیجه حاصل، بازتابی بهتر از اثر عامل مورد آزمایش، به‌طور مثال سیر بر مارکر مورد بررسی (در این مطالعه نیتریک

¹ - Schwartz

حاضر از استونیتریل به منظور پروتئین زدایی استفاده شد. نتایج آزمایش ما نشان می‌دهند که در روش گریس به‌تنهایی، حجمی بالا از نیتریک اکساید موجود در نمونه سرمی قابل تشخیص و سنجش نیست و با توجه به نقش استونیتریل، هم به‌عنوان احیاکننده نیترات به نیتريت و هم به‌عنوان رسوب‌دهنده پروتئین موجود در سرم، میتوان ادعا کرد که روش گریس همراه با استونیتریل، روشی مناسب‌تر و قابل‌استنادتر برای سنجش نیتریک اکساید در سرم است.

به‌طور کلی، یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهند 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 مشاهده می‌شود؛ 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 پیشنهاد می‌شود.

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 Patherm in L.major infected Balb/c mice. Scand J of Immunol. 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.

اکساید) را در شرایط طبیعی بدن فرد نشان می‌دهد و ۲. نوع روش سنجش است؛ باید توجه داشت که به دلیل کوتاه‌بودن نیمه عمر نیتریک اکساید، اندازه‌گیری آن به‌نسبت، مشکل است لذا اندازه‌گیری آن با استفاده از متابولیت‌های پایدارش، یعنی نیتريت و نیترات صورت می‌گیرد؛ این سنجش، تخمینی قابل‌اطمینان از برون‌ده نیتریک اکساید در محیط درون‌تنی فراهم می‌آورد (۲۰). همبستگی بالایی میان تولید نیتریک اکساید درون‌زا و سطوح نیتريت یا نیترات (NOx) در سرم، پلازما و ادرار گزارش شده است (۲۱). ساده‌ترین روش، رنگ‌سنجی برمبنای واکنش گریس است که در این روش، میزان نیتريت سنجش می‌شود (۲۰)؛ در نتیجه، استفاده از روش‌هایی که نیتريت و نیترات را با هم بسنجند، مناسب‌تر خواهد بود که در این مطالعه از روشی دیگر (افزودن استونیتریل) برای تبدیل نیترات به نیتريت و سنجش مجموعه نیترات + نیتريت نیز استفاده شد.

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 پروتئین زدایی، ضروری است (۲۲) و با توجه به نتایج مطالعات مختلف (۲۳، ۲۴)، در مطالعه

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.

15. Ghasemi A, Hedayati S, Biabani H. Protein precipitation methods evaluated for determination 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 griess reaction. *Pajouhesh dar pezheshki*. 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.

Evaluation of the effect of *Allium sativum* aqueous extract on serum nitric oxide in mice

Sekineh Moaiedmohseni¹, Hamideh Rohani², Marzieh Eghtedardoost³, Seyed Mohammadreza Emadi², Mehrdad Roghani⁴, Tooba Ghazanfari^{3*}

1. Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.
2. Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.
3. Immunoregulation Research Center, Shahed University, Tehran, Iran.
4. Neurophysiology Research Center and Department of Physiology, Shahed University, Tehran, Iran.

* E-mail: tghazanfari@yahoo.com

Abstract

Background and Objective: *Allium sativum* or garlic belongs to Liliaceae family. Garlic has been used in the Iranian Traditional Medicine for treatment of different diseases like infections, cancers, digestion disorders and heart diseases. Nitric oxide (NO) is produced in immunity response and inflammatory conditions. According to immunomodulator effect of garlic, the effect of garlic extract on serum metabolites of NO (nitrite and nitrate) in balb/c mice was studied.

Material and Methods: In this experimental study, 30 balb/c mice (female, 6-8 weeks old) were divided into 6 groups (three groups received garlic and three groups as control). Each mouse received 20 mg/kg/day of garlic extract intraperitoneally for one week (mice in control groups received normal saline). Mice were killed at 24 hours, 1st and 2nd weeks after garlic extract treatment. Serum was prepared and nitrite and nitrate were assayed by Griess method. Meanwhile, t test was used for statistical analysis.

Results: Primary nitrite increased by 7.5% and 29% and nitrite +nitrate increased by 42% and 12% in 24 hours and one week after last injection, respectively. Primary nitrite decreased by 2.5% and nitrite +nitrate increased by 4/8% two weeks after last injection. All t-test values were not significant.

Conclusion: One week administration of 20 mg/kg of garlic extract increases serum NO metabolites levels time dependently but not significantly and this effect weakens with time.

Keywords: *Allium sativum*, Serum nitric oxide, Griess reaction, Acetonitril, Balb/c mice.