بررسی اثر عصاره ترکیبی سیر و لیموترش بر ریسک فاکتور التهابی آترواسکلروزیس (hs-CRP) در رت‌های نر نژاد ویستار تحت رژیم پرچرب

پگاه برادران خلخالی، سید علی حائری روحانی، پریچهره یغمایی*

گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* مسئول مکاتبات: yaghmaei_p@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/٤/۸

چکیده

مشکلات قلبی عروقی بویژه آترواسکلروزیس یکی از بیماری‌های شایع در جهان است. پروتئین فاز حاد (hs-CRP) حساس‌ترین شاخص التهابی است که در تحقیقات جدید نشان داده شده مقادیر سرمی آن می‌تواند خطر معضلات قلبی را پیش‌بینی نماید. سیر (*Allium sativum*) و لیمو ترش (*Citrus limon*) هر دو از گیاهانی هستند که در درمان‌های سنتی مشکلات قلبی-عروقی کاربرد دارند ولی ترکیب آن دو با یکدیگر تاکنون بررسی نشده است. مطالعه حاضر، یک پژوهش تجربی مداخله‌ای است که تاثیرات ضدالتهابی و هیپولیپیدمیک عصاره ترکیبی سیر و لیمو ترش را در موش صحرایی نژاد ویستار که به مدت ۹ هفته تحت تغذیه با رژیم پرچرب قرار گرفته‌اند، بررسی می‌کند. ٤۲ سر رت نر بالغ با وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم به شش گروه هفت‌تایی تقسیم شدند. گروه کنترل و گروه تجربی ۳ با غذای عادی جوندگان و گروه کنترل چاقی، شم، تجربی ۱و تجربی ۲ با رژیم پر چرب تغذیه شدند. پس از رسیدن به وزن مطلوب، عصاره ترکیبی سیر و لیمو در دوز ۲۲۰ میلی‌گرم ماده خشک محلول در آب مقطر به گروه‌های تجربی ۱ و ۳ و در دوز ٤٤۰ میلی‌گرم به گروه تجربی ۲، برای مدت چهار هفته خورانده شد. سرم حاصل از نمونه‌گیری خون برای سنجش CRP و کلسترول تام مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج با آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) و روش مقایسه‌های چند گانه توکی مورد آزمون قرار گرفت. عصاره ترکیبی سیر و لیمو کاهش معنی‌داری را در کلسترول تام سرم گروه‌های تجربی ۱ و ۲ نشان داد ($p <$ ۰/۰۰۱). همچنین یک کاهش معنی‌دار CRP در گروه تجربی ۲ که با دوز دو برابر تیمار شده بودند دیده شد ($p <$ ۰/۰۵). هیچ تغییر معنی‌داری از تاثیر عصاره ترکیبی بر روی گروه تجربی ۳ که با رژیم غذایی عادی تغذیه شده بودند، مشاهده نگردید. به نظر می‌رسد عصاره ترکیبی سیر و لیمو ترش در مبتلایان به هایپرکلسترولمی تاثیرات ضدالتهابی و محافظتی بر عروق دارد.

کلمات کلیدی: آترواسکلروزیس، پروتئین فاز حاد، سیر، لیموترش، هایپرلیپیدمی، رت ویستار.

مقدمه

در سال‌های اخیر اهمیت فاکتورهای انعقادی و التهابی در تشخیص مشکلات قلبی عروقی از یکسو و تحقیقات متنوع درباره خواص دارویی گیاهان خوراکی بسیار مورد توجه متخصصین قرار گرفته است. اگرچه اختلاف نظرهایی میان محققین راجع به در نظرگرفتن برخی شاخص‌های خطر برای پیش‌بینی مشکلات قلبی عروقی وجود دارد. اما در سال‌های اخیر اکثر محققین افزایش شاخص‌های التهابی شامل پروتئین فاز حاد با حساسیت بالا (با نام اختصاری CRP)، گلبول‌های سفید خون، پلاکت و گاهی

فیبرینوژن را نیز از مشخصه‌های بیماری‌های قلبی عروقی می‌دانند (١٤). پروتئین فاز حاد با حساسیت بالا که به واکنشگر C نیز معروف است، پروتئینی هوموپنتامر است که با وزن مولکولی ١١٥ کیلودالتون به خانواده پنتراکسین تعلق دارد. و در مقادیر پایین در شرایط التهابی توسط کبد تولید و به واسطه اینترلوکئین ٦ در خون حمل می‌شود (١١).

شواهد نشان می‌دهد که CRP یکی از قوی‌ترین شاخص‌های مستقل پیش‌بینی‌کننده مشکلات کرونر قلب است که به طور مستقیم در فرآیندهای آتروژنز بوسیله تعدیل عملکرد اندوتلیال شرکت می‌کند و غلظت آن به عنوان یک شاخص پیش‌بینی اتفاقات قلب و عروق شناخته شده است (١٣).

سیر (*Allium sativum*) گیاهی است یک ساله متعلق به خانواده *Alliacae* که در پزشکی سنتی کاربرد وسیعی دارد. ترکیبات متعددی در سیر وجود دارند که خواص آنها به اثبات رسیده است با این وجود آلیسین معروف‌ترین ترکیب موثره در سیر است (٣٠).

مطالعات اپیدمیولوژیک ارتباط معکوسی را بین مصرف سیر و بیماری های قلبی و عروقی نشان می دهد. مطالعات in vitro قابلیت سیر را در کاهش بسیاری از پارامترهای دخیل در آترواسکلروزیس و خصوصاً مهار آنزیم‌های درگیر در سنتز لیپیدها تایید می‌نماید. در آزمون‌های کلینیکی نیز بیشترین تاثیرات کاهنده کلسترول و فشار خون و نیز مهار تجمع پلاکتی از گیاه سیر گزارش شده است (٢، ٢٦).

لیموترش (*Citrus limon*) متعلق به خانواده Rutaceae، میوه درخت همیشه سبز کوتاهی است که عصاره آن کاربرد غذایی و دارویی دارد (٢١).

بر اساس آنچه که از تحقیقات استنتاج می‌شود پیش فرض هایی مطرح شده مبنی بر اینکه دریافت برخی از غذاها و نوشیدنی‌هایی که حاوی غلظت‌های نسبتا بالایی از فلاوونوئیدها می‌باشند ممکن است در کاهش خطرات قلبی عروقی از طریق بهبود عملکرد عروق و تعدیل فاکتورهای التهابی نقش ایفا نماید (١١). مطالعات *in vitro* نیز چنین نتایجی را تایید می‌کند گرچه مکانیسم‌های مسئول در فعالیت فلاونوئیدها هنوز به طور کامل مشخص نیست (١، ٤، ١٥).

در چند سال اخیر استفاده از ترکیب عصاره سیر و لیموترش در دوره‌های منظم زمانی در بین مبتلایان به گرفتگی عروق و حتی افراد سالم (جهت پیشگیری) رواج چشم‌گیری پیدا کرده است. استفاده از این ترکیب هرچند از نظر علمی تا کنون مورد بررسی قرار نگرفته است، لیکن مشاهدات افراد عامّه بر مؤثر بودن آن در بهبود یا پیشگیری از بروز گرفتگی عروقی دلالت داشته است. در پژوهش‌های منتشر شده در خصوص تاثیر هر یک از دو گیاه سیر و لیموترش بر سیستم قلب و عروق گاه تناقضاتی نیز به چشم می-خورد (٣١، ١٧). با این وجود، به لحاظ تئوری، احتمال وجود اثرات هم‌افزایی (سینرژیستی) و اصلاحی ترکیب این دو گیاه جهت درمان مشکلات اترواسکلروزیس، دور از ذهن نمی‌باشد (٢٤).

لذا تحقیق پیش رو، با انتخاب شاخص CRP به عنوان یک شاخص کلیدی در التهابات هایپر کلسترولمیا قصد دارد به بررسی دقیق‌تر این موضوع بپردازد.

مواد و روش کار

حیوانات مدل: تعداد ٤٢ سر رت نر نژاد ویستار با میانگین وزنی ٢٠٠ تا ٢٥٠ گرم از محل نگهداری و پرورش حیوانات آزمایشگاهی واقع در آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران خریداری و به اتاق حیوانات شماره ٥ در همان مکان انتقال و در قفس‌های مخصوص نگهداری رت از جنس پلی-کربنات شفاف با قابلیت اتوکلاو و استیل ضدزنگ

ساخت شرکت صنعتی رازی راد و در شرایط متعارف نگهداری شدند. درجه حرارت اتاق ۲۰ الی ۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ٦٥ درصد و روشنایی به صورت نور مصنوعی تایمردار با زمان‌بندی ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی تامین می‌گردید (۲۳). بعد از یک هفته سازگاری با محیط، حیوانات به دقت با ترازوی دیجیتال وزن شده و به طور تصادفی در ٦ گروه هفت‌تایی مورد مطالعه به شرح زیر تقسیم شدند:

۱- گروه کنترل منفی: حیواناتی هستند که در شرایط آزمایشگاهی نگهداری شده و آب و غذای معمولی مخصوص جوندگان را دریافت نمودند. به طور معمول ۱۱ درصد کیلوکالری انرژی غذا از منابع مختلف چربی، ٥٥ درصد از کربوهیدرات و ۳٤ درصد از پروتئین تامین می‌شود (۲۰).

۲- گروه کنترل چاقی: حیواناتی هستند که در شرایط آزمایشگاهی نگهداری شده و به مدت ۹ هفته تحت رژیم غذایی پرچرب جهت القاء چاقی قرار گرفتند. به طور معمول برای رژیم‌های غذایی که به این منظور به کار می‌روند، ٤٥ درصد کیلوکالری انرژی غذا از منابع مختلف چربی، ۳٥ درصد از کربوهیدرات و ۲۰ درصد از پروتئین تامین می‌شود (۱۷، ۱۰).

۳- گروه شم: حیواناتی هستند که در شرایط آزمایشگاهی نگهداری شده، به مدت ۹ هفته تحت رژیم غذایی پرچرب قرار گرفته و حلال عصاره‌ها (آب مقطر) را به مدت ٤ هفته به طریق گاواژ دریافت کردند.

٤- گروه تجربی۱: حیواناتی هستند که در شرایط آزمایشگاهی نگهداری شده، تحت تغذیه با رژیم غذایی پرچرب قرار داشته و عصاره ترکیبی سیر و لیمو را با دوز ۲۲۰ میلی‌گرم ماده خشک محلول در آب مقطر به مدت ٤ هفته به شیوه گاواژ دریافت کردند.

٥-گروه تجربی۲: حیواناتی هستند که در شرایط آزمایشگاهی نگهداری شده، تحت تغذیه با رژیم غذایی پرچرب قرار داشته و عصاره ترکیبی سیر و لیمو را حسب دو برابر دوز (٤٤۰ میلی‌گرم ماده خشک محلول در آب مقطر) به مدت ٤ هفته به شیوه گاواژ دریافت کردند.

٦-گروه تجربی۳: حیواناتی هستند که در شرایط آزمایشگاهی نگهداری شده، آب و غذای معمولی دریافت و عصاره ترکیبی سیر و لیمو را با دوز ۲۲۰ میلی گرم ماده خشک محلول در آب مقطر به مدت ٤ هفته به شیوه گاواژ دریافت کردند.

القاء چاقی به حیوانات: به منظور القای چاقی در گروه‌های مورد نظر، رژیم غذایی پر چرب تهیه و از روز دهم با غذای عادی گروه‌های مذکور به جز گروه کنترل منفی و گروه تجربی ۳ جایگزین گردید. تغذیه جدید به مدت ۹ هفته ادامه یافت.

تیمار حیوانات با عصاره ترکیبی و نمونه‌گیری نهایی: پس از ٥ هفته تغذیه گروه‌ها با رژیم پرچرب و انجام نمونه گیری، تیمار برای گروه‌های تجربی ۱، تجربی ۲ و تجربی ۳ آغاز گردید. به همین منظور، عصاره ترکیبی سیر و لیموترش مشابه دستورالعمل رایج در طب گیاهی (۱۷) به روش زیر تهیه گردید : تعداد ٥ عدد لیموترش تازه متوسط گونه *Citrus limon* (لیمو شیرازی) از بازار تهیه و با آب تمیز به دقت شسته و به قطعات کوچکتر تقسیم و دانه‌گیری شد. لیموها به همراه ۳۰ حبه درشت سیر (۱٥۰ گرم) پوست گرفته شده در دستگاه مخلوط کن به مدت ۳ دقیقه مخلوط شده و به صورت یکنواخت در آمد. سپس به مخلوط فوق نیم لیتر آب مقطر اضافه و مجددا یک دقیقه در دستگاه مخلوط کن همگن شد. مخلوط فوق در ظرف غیرفلزی تا دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد و پس از خنک شدن از دو لایه صافی (تنظیف) و یا گاز استریل با قطر منافذ

نیم میلی‌متر عبور داده شد. مایع غلیظی که به این ترتیب به دست آمد عصاره ترکیبی نامیده شد و در دمای یخچال نگهداری گردید.

دوز مصرفی مناسب (۲۷) بر اساس دوز مصرفی انسانی محاسبه و هر روز در ساعت مقرر (۲ بعد از ظهر) و زمانی که تقریبا معده جانور از تغذیه شبانه خالی شده بوسیله سرنگ گاواژ به حیوانات خورانده شد. گروه شم نیز به همان میزان حلال دارو (آب مقطر) دریافت نمود. تیمار گروه‌ها با عصاره ترکیبی به مدت ٤ هفته ادامه پیدا کرد. در پایان هفته چهارم تیمار(هفته دهم آزمون)، همه گروه‌ها به مدت ٣٦ ساعت تحت تغذیه با آب و غذای معمولی قرار گرفتند و قبل از نمونه گیری نهایی ١٤ الی ١٦ ساعت در حالت ناشتا به سر بردند. آب سالم بهداشتی در اختیار همه گروه‌ها قرار داشت. نمونه‌گیری نهایی راس ساعت ۸ صبح آغاز گردید. ابتدا حیوانات با تزریق داخل صفاقی داروی بیهوشی کتامین با دوز ۱۰۰–۸۰ میلی گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن و داروی زایلازین با دوز ۱۰–۵ میلی گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن بیهوش شدند (۲۷).

سپس خونگیری از قلب انجام گرفت. نیم میلی‌لیتر نمونه خونی به میکروتیوب حاوی ماده ضدانعقاد اتیلن‌دی‌آمین ترا استیک اسید (EDTA) منتقل و به خوبی مخلوط گردید. و مابقی در لوله آزمایش برای جداسازی سرم جمع آوری و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ گردید. سرم جداسازی شده در دمای انجماد نگهداری و جهت سنجش فاکتور التهابی مورد نظر به آزمایشگاه آزمایشگاه پاتوفیزیولوژی بیمارستان دامپزشکی واقع در جنب دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران منتقل گردید.

اندازه‌گیری پروتئین فار حاد (hs-CRP): اندازه-گیری CRP کار بسیار دقیق و حساسی است. برای به حد اقل رساندن خطای انسانی و دستگاهی کلیه مراحل کار توسط یک متخصص و یک نوع کیت (hsCRP Rat/mouse ELISA Kit, Cosmo Bio Co. Ltd. Japan) انجام گرفت. سنجش CRP در مورد برخی از نمونه‌ها ۲ تا ۳ نوبت تکرار شد. سنجش این پروتئین با استفاده از روش ایمونوتوربیدومتری می‌باشد، CRP موجود در نمونه با آنتی‌بادی پلی کلونال حساس شده بر علیه CRP موش که بر ذرات لاتکس Coat شده است تشکیل کمپلکس داده و کدورت ایجاد می‌کند. مقدار کدورت ایجاد شده با مقدار CRP موجود در نمونه رابطه مستقیم دارد. نمونه ها بعد از مخلوط کردن به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و سپس معرف حاوی آنتی‌بادی بر علیه CRP اضافه شد. بعد از مخلوط کردن به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مجددا انکوبه شده و جذب نوری اولیه قرائت گردید و جذب نوری ثانویه بعد از ۹۰ ثانیه خوانده شد. با استفاده از کالیبراتورهای داخل کیت که حاوی غلظت های مشخصی از CRP هستند یک منحنی استاندارد رسم شد. روش محاسبه به این ترتیب است که ابتدا اختلاف جذب نوری اولیه و ثانویه را پیدا کرده سپس با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت CRP موجود در نمونه به دست می‌آید.

روش آماری: کلیه نتایج به دست آمده با نرم‌افزار SPSS و روش ANOVA یک طرفه (آزمون F یا تحلیل واریانس) و آزمون توکی(Tukey Post hoc.) با سطوح معنی‌داری ۹۵٪ ، ۹۹٪ و ۹۹/۹٪ (p< ۰/۰۵ *، p< ۰/۰۱ **، p< ۰/۰۰۱ *** تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه شم و p< ۰/۰۵ ×، p< ۰/۰۱ ××، p< ۰/۰۰۱ ××× تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل چاقی) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و نمودارهای مربوطه در برنامه Excell رسم گردید.

نتایج

نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها و بررسی معنی‌داری تفاوت میانگین کلسترول تام گروه‌ها در نمودار ۱، CRP در نمودار ۲ و شمارش افتراقی گلبول‌های سفید در نمودار ۳ ارائه شده است. با توجه به نمودارهای ۱، ۲ و ۳ می‌توان نتایج حاصله را به ترتیب زیر خلاصه نمود:

۱- تفاوت معنی‌داری (p<۰/۰۰۱ ***) بین کلسترول تام گروه‌های کنترل منفی و کنترل مثبت (کنترل چاقی)، شم و گروه تجربی۱ دیده می‌شود. این نتیجه مؤید آن است که رژیم پرچرب توانسته است مقدار کلسترول تام خون حیوانات مدل را افزایش دهد. اما تفاوت معنی‌داری در خصوص CRP گروه های یادشده به چشم نمی خورد.

۲- تفاوت معنی‌داری (p<۰/۰۰۱ ***) بین کلسترول تام گروه‌های کنترل منفی و گروه تجربی۱ دیده می‌شود. درحالیکه هیچ تفاوت معنی‌داری ما بین گروه کنترل چاقی با گروه تجربی ۱ نیست. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که دوز متعارف عصاره ترکیبی تاثیر کاهشی چندانی بر کلسترول تام حیوانات مدل چاقی نداشته است. هچنین تفاوت معنی‌داری در خصوص CRP گروه‌های یادشده به چشم نمی‌خورد.

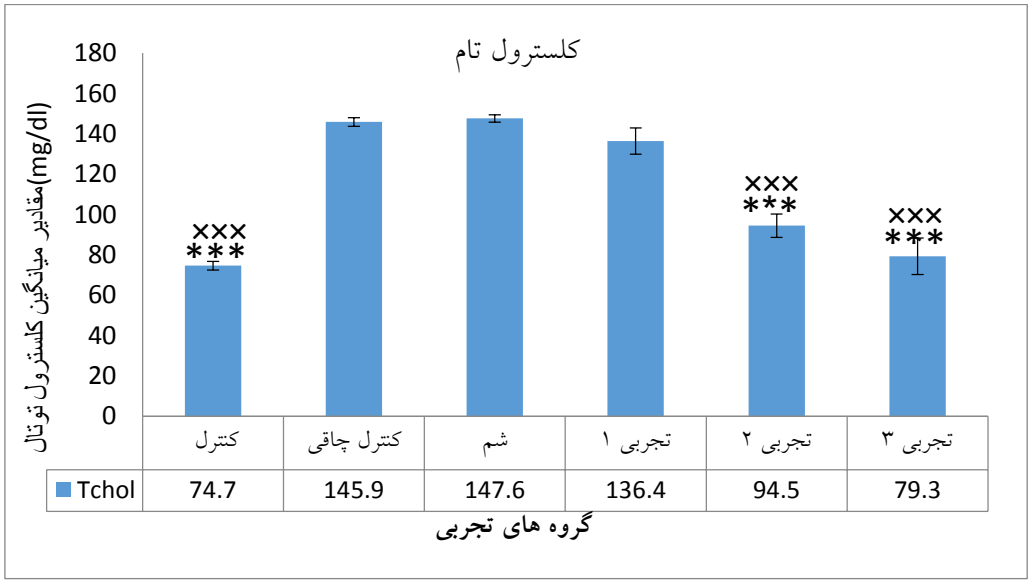
۳- تفاوت معنی‌داری (p<۰/۰۰۱ ×××) بین کلسترول تام گروه کنترل مثبت (کنترل چاقی) و گروه شم با گروه تجربی۲ دیده می‌شود. در خصوص CRP نیز تفاوت معنی‌داری (p<۰/۰۵ ×) مابین گروه کنترل مثبت (کنترل چاقی) و گروه تجربی۲ دیده می‌شود. اما تفاوت معنی داری ما بین CRP گروه تجربی ۲ با گروه شم نیست. این نتایج مؤید آن است که عصاره ترکیبی با دوز دو برابر توانسته است کلسترول تام خون حیوانات مدل را با اطمینان ۹۹/۹ درصد کاهش دهد. اما درخصوص CRP این ضریب اطمینان ۹۵ درصد است.

٤- تفاوت معنی‌داری (p<۰/۰۰۱ ×××) بین کلسترول تام گروه‌های کنترل مثبت (کنترل چاقی) و گروه تجربی۳ دیده می‌شود. در حالیکه هیچ تفاوت معنی-داری ما بین گروه کنترل منفی و گروه تجربی ۳ دیده نمی‌شود. این نتیجه نشان می‌دهد که عصاره ترکیبی بر کلسترول تام خون حیواناتی که تغذیه عادی داشته‌اند تاثیری نداشته است.

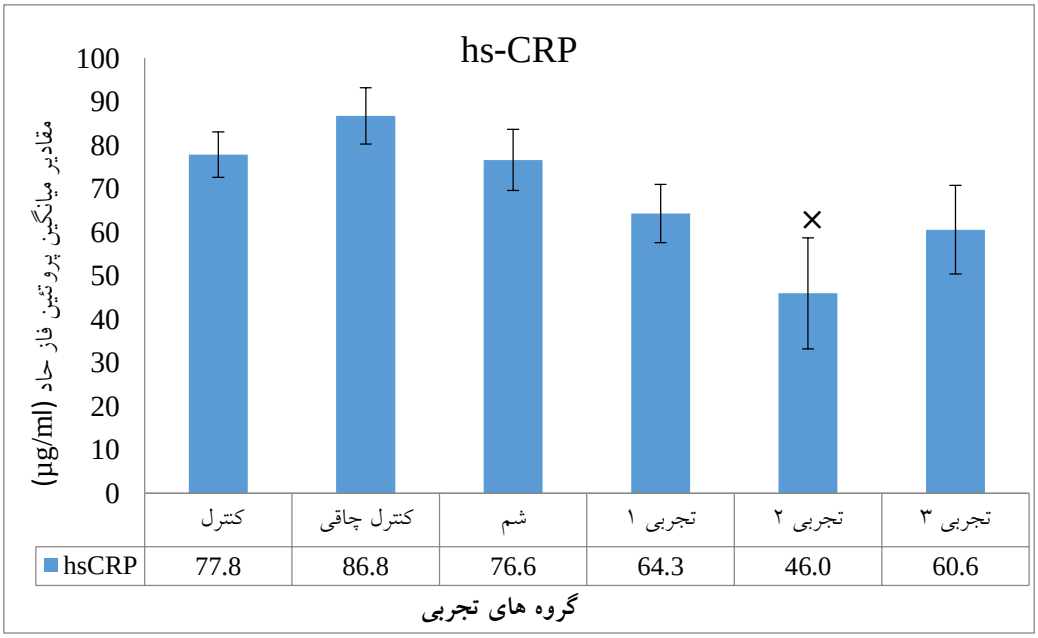
۵- تفاوت معنی‌داری (p<۰/۰۰۱***) بین کلسترول تام گروه شم و گروه‌های تجربی ۱و ۲ و ۳ دیده می-شود. این نتیجه نیز مؤید آن است که استرس‌های جانبی تاثیر چندانی بر مداخله درمانی نداشته و عصاره ترکیبی توانسته است مقدار کلسترول تام خون حیوانات مدل را کاهش دهد. اما نتیجه‌گیری مشابهی در خصوص تاثیر عصاره ترکیبی بر CRP به دلیل معنی‌دار نبودن تفاوت میان گروه تجربی ۲ و شم نمی توان داشت.

٦- با توجه به نمودار ۲، با ضریب اطمینان p <۰/۰۵، تفاوت معنی‌داری بین CRP گروه کنترل چاقی و تجربی ۲ وجود دارد. با توجه به اینکه تفاوت گروه شم با تجربی ۲ در این سطح معنی‌دار نیست اما در p<۰/۱ تفاوتی را نشان می‌دهد که قابل تامل است. لذا پیشنهاد می‌شود که عصاره ترکیبی با دوز بالا احتمالا بتواند در کاهش ریسک فاکتور التهابی CRP تاثیرگذار باشد. برای اثبات این موضوع به آزمایشات دقیق‌تر بعدی نیاز هست.

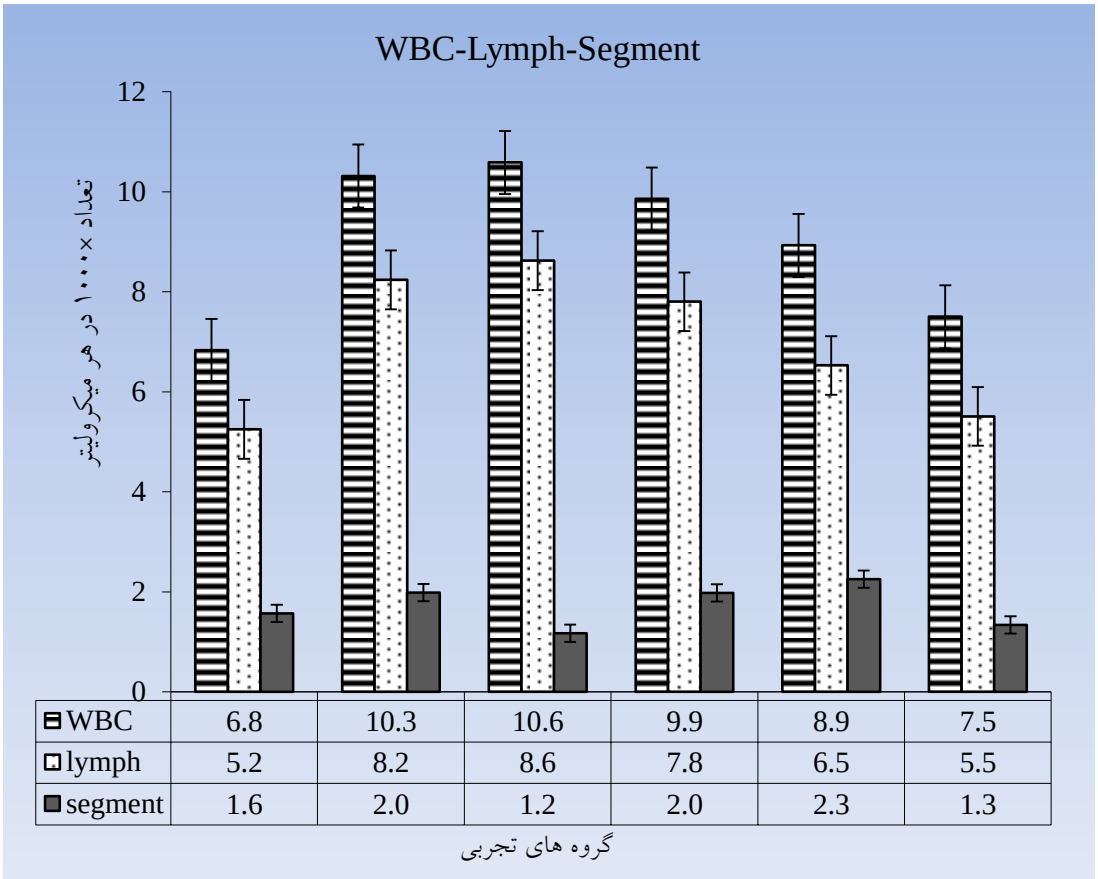
۷- با توجه به نمودار ۳، تفاوت میانگبن تعداد لکوسیت‌ها در هیچ یک از گروه‌ها معنی‌دار نبود. همچنین درصد لنفوسیت و نوتروفیل در گروه‌ها تغییر معنی داری نداشته است. البته با ضریب اطمینان ۸۰ درصد یک افزایش میانگین در گروه‌های کنترل و شم که تحت تغذیه با رژیم پرچرب قرار داشتند دیده می شود. همچنین تعداد لنفوسیت‌های گروه‌های تجربی ۱ و ۲ نسبت به گروه‌های کنترل چاقی و شم پایین‌تر است.



نمودار ۱- مقایسه اثر عصاره ترکیبی سیر و لیمو با دوزهای ۲۲۰ mg/kg (تجربی ۱و۳) و ٤٤٠ mg/kg (تجربی ۲) بر میزان کلسترول تام سرم در مقایسه با گروه شم و کنترل چاقی. هر ستون بیانگر میانگین ± انحراف معیار برای نمونه خونی از هفت سر رت می‌باشد. ۰/۰۵ >p * ، ۰/۰۱ >p ** ، ۰/۰۰۱ >p *** تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه شم و ۰/۰۵ >p × ، ۰/۰۱ >p ×× ، ۰/۰۰۱ >p ××× تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل چاقی می‌باشد.



نمودار۲- مقایسه اثر عصاره ترکیبی سیر و لیمو با دوزهای ۲۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (تجربی ۱) و ٤٤٠ میلی‌گرم بر کیلوگرم (تجربی ۲) بر CRP سرم در مقایسه با گروه شم و کنترل چاقی. هر ستون بیانگر میانگین ± خطای معیار برای نمونه خونی از هفت سر رت می‌باشد. ۰/۰۵ >p * ، ۰/۰۱ >p ** ، ۰/۰۰۱ >p *** تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه شم و ۰/۰۵ >p × ، ۰/۰۱ >p ×× ، ۰/۰۰۱ >p ××× تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل چاقی می‌باشد.



نمودار۳- تعداد لنفوسیت (lymph) و نوتروفیل (segment) نسبت به لکوسیت‌های (WBC) هر گروه (×۱۰۰۰ در هر میکرولیتر) تحت تاثیر عصاره ترکیبی سیر و لیمو با دوزهای ۲۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (تجربی ۱و۳) و ٤٤٠ میلی‌گرم بر کیلوگرم (تجربی ۲). محور عمودی: تعداد لکوسیت، تعداد لنفوسیت و نوتروفیل (×۱۰۰۰ در هر میکرولیتر). محور افقی: گروه‌ها از چپ به راست شامل کنترل، کنترل چاقی، شم، تجربی ۱، تجربی۲ و تجربی ۳. هر ستون بیانگر میانگین‌ها ± خطای معیار برای نمونه خونی از هفت سر رت می‌باشد.

بحث

استفاده از رژیم‌های غذایی سرشار از چربی‌های حیوانی (اعم از بافتی و لبنی) می‌تواند به طور فزاینده ای فاکتورهای خطر قلبی عروقی را افزایش دهد. این موضوع بارها از طریق پژوهش‌های تجربی و اپیدمیولوژیکی به اثبات رسیده است. نسبت بالای کلسترول تام به HDL که حاکی از افزایش لیپوپروتئین‌های با وزن مخصوص کم است می‌تواند زمینه التهاب عروق کرونر را فراهم کرده و باعث پرفشاری خون و حمله قلبی باشد. در این خصوص، CRP می‌تواند یک شاخص قابل استناد در مورد انسان باشد. چنانکه تحقیقات بسیاری این موضوع را تایید نموده است (۸، ١٤) و با نتایج حاصل از پژوهش اخیر همخوانی دارد (نمودارهای ۱ و ۲).

تجمع لیپوپروتئین‌های با دانسیته پایین در دیواره عروق می‌تواند آغاز کننده فرایند تشکیل آتروم و زمینه ساز التهاب دیواره داخلی شریان باشد. البته باید یادآور شد که فاکتورهای التهابی از جمله CRP، چند سالی بیشتر نیست که به عنوان شاخص خطر قلبی (پیش‌بینی‌کننده) پذیرفته شده‌اند و هنوز هم در تحقیقات منتشر شده اختلاف نظرهایی در این

خصوص به چشم می‌خورد. بنابراین باید مد نظر داشت که خود موضوع CRP یک مسأله به روز در تحقیقات پایه پزشکی محسوب می‌شود. تنها چیزی که مسلم است این است که بین افزایش مقدار CRP سرم و ایجاد آترواسکلروزیس یک رابطه مثبت وجود دارد و CRP در ضایعه آتروم نقش ایفا می‌کند اما اینکه آیا این نقش، محافظت کننده است یا در ایجاد ضایعه نقش دارد، پرسشی است که هنوز پاسخی به آن داده نشده است (۲۸).

هرچند Padilla و همکارانش در سال ۲۰۰۳ طی یک پژوهش تجربی اعلام کردند که CRP رت، عملکردی همانند CRP انسان دارد، Kalsait و همکارانش در ۲۰۱۱ با تغذیه پر کلسترول رت‌های ویستار و آزمون CRP نشان دادند که CRP رت را نمی‌توان به عنوان شاخص خطر آترواسکلروز مدل سازی شده در نظر گرفت زیرا تغییرات معنی داری در CRP رت‌های سالم و آترواسکلروز که به مدت ۱۲۰ روز تحت رژیم پرچرب بوده اند، دیده نشد. در حالیکه در پژوهش‌های انسانی بین چاقی و افزایش سطح CRP سرم رابطه مستقیم وجود دارد (۵). بنابراین همانطور که در نتایج مربوط به CRP در نمودار ۲ مشاهده می‌شود، نمی‌توان با قاطعیت اعلام کرد که رژیم پرچرب در این مدت زمانی محدود توانسته CRP را در حیوانات تحت رژیم پرچرب افزایش دهد زیرا تغییرات معنی‌داری مابین CRP گروه‌های کنترل و کنترل چاقی و شم دیده نشد که این نتیجه با یافته‌های Kalsait و همکارانش در یک راستا می‌باشد. به علاوه، در پژوهش حاضر تفاوت معنی‌داری بین CRP گروه تیمار شده با عصاره ترکیبی (تجربی۲) و گروه کنترل چاقی دیده می‌شود (نمودار ۲). بنابراین شاید بتوان احتمال داد که CRP رت نیز مشابه CRP انسانی به مداخلات دارویی پاسخ می‌دهد. در هر صورت پیشنهاد می‌شود برای تعمیم نتایج مدل‌سازی حیوانی در ارتباط با ایجاد التهابات چاقی و آترواسکلروتیک به مدل های انسانی، تا انجام تحقیقات وافی و کافی در این خصوص با احتیاط کامل عمل شود.

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان می‌دهد عصاره ترکیبی سیر و لیمو می‌تواند بر روی کلسترول که خود یکی از ریسک فاکتورهای قلبی عروقی محسوب می-شود، تاثیر داشته باشد. تاکنون تحقیقاتی که در ارتباط با فواید قلبی عروقی سیر و لیمو انجام شده بیشتر حول محور اندازه‌گیری شاخص های خطر متداولی همچون ترکیبات قند و چربی، کلسترول و همین طور فشار خون بوده است که نتایج حاصل از این پژوهش را تایید می‌کند (۱، ٤، ۲۸).

البته در جهان تحقیقات بیشتری بر روی سیر نسبت به لیمو انجام گرفته است که گاه نتایج ضد و نقیض نیز در این میان به چشم می‌خورد (۲۵). در برخی سیر را فاقد قابلیت موثر بر مشکلات قلبی عروقی معرفی می‌کنند در حالی که در تحقیقات مروری دیگری سیر را به عنوان یک کاهنده موثر ریسک فاکتورهای آترواسکلروزیس به اثبات رساند (۱۲، ۲۵).

به نظر می‌رسد نتایج حاصل از پژوهش حاضر نیز مطالعات Jepson را تایید می نماید. کاهش کلسترول تام با ضریب اطمینان ۹۹/۹ درصد در حیوانات تیمار شده با عصاره ترکیبی، حاکی از وجود خواص هایپولیپیدمیک قوی در سیر و لیمو است. البته به نظر می‌رسد دوز دو برابر در این خصوص بهتر عمل کرده باشد. همانطور که از منابع مختلف برمی‌آید عصاره سیر به دلیل داشتن اثرات ضد استرس اکسیداتیو قوی، نقش موثری در کاهش کلسترول تام سرم داشته باشد (۲٦).

سیر بعد از کلم قرمز بالاترین مقدار آنتی اکسیدان ثبت شده را دارد. عصاره کامل لیمو نیز به سبب داشتن مقادیر متنابهی از فلاونوئیدها، مونوترپن‌ها، اسید

اسکوربیک و فیبر، خاصیت هیپوکلسترولمیک از خود نشان دهد (۱۵). با این وجود در ارزیابی‌های مرتبط با تاثیر مرکبات بر مشکلات قلبی عروقی کمتر به لیمو ترش پرداخته شده است. از این میان نیز اغلب آب لیمو را مورد بررسی قرار داده‌اند (۱، ۲٤، ۱۵).

بنابراین می‌توان مشاهده کرد که تاکنون در تحقیقات انجام شده توجه چندانی به عملکردهای عصاره کامل لیمو (همراه پالپ) نشده بوده و آن تعداد پژوهش‌های محدودی نیزکه اثر پالپ لیمو را بررسی کرده‌اند نتایج متفاوتی نسبت به آب لیمو گرفته‌اند (۳).

در آزمایشی که بشتام و همکارانش در سال ۲۰۰۹ انجام دادند، تیمار خرگوش‌های آتروژنز توسط آب و پوست خشک شده لیمو (*Citruse lemon*) نه تنها باعث کاهش معنی‌داری در سطح لیپوپروتئین‌های سرم نشد بلکه باعث افزایش معنی‌داری در LDL گروه-های تیمار گردید.

در حالی که Khan و همکارانش در سال ۲۰۱۰ همین آزمون را با دوز ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم آب لیمو انجام داده و نتایج متفاوتی گرفتند. کاهش معنی‌داری در پروفایل لیپیدی سرم و افزایش معنی‌دار HDL سرم در خرگوش‌های تیمار شده دیده شد که به اثرات آنتی‌اکسیدانی لیموترش نسبت داده شد.

تحقیق مشابه دیگری که توسط یغمایی و همکارانش در سال ۲۰۱۰ بر روی رت ویستار انجام شده بود، تیمار با پوست لیمو کاهش معنی‌داری را در میزان کلسترول تام پلاسما نشان داد (۳۲).

پژوهش حاضر نیز این نتایج را تایید می‌کند. بنابراین یکی از موضوعات مهم قابل بحث، ترکیبات دارویی و تاثیرات متفاوت و گاه متقابل آنهاست که در ادامه بیشتر به آن می‌پردازیم.

همانطور که اشاره شد، فلاونوئیدها بخش مهمی از ترکیبات موثره پوست، پالپ و آب لیمو را تشکیل می‌دهند. طبق شواهد اثبات شده، فلاونوئیدها به عنوان مهارکننده آنزیم (HMG- CoA) ردوکتاز قادرن دنقش هایپوکلسترولمیک خود را ایفا نمایند (۵، ۹).

در خصوص تاثیرات عصاره ترکیبی سیر و لیمو بر CRP نیز همانطور که از نتایج نمودار ۲ بر می آید، دوز دو برابر عصاره توانسته است شاخص التهابی CRP سرم را با ضریب اطمینان ۹۵ درصد نسبت به گروه کنترل چاقی کاهش دهد. همانطور که می‌دانیم گیاه سیر از روزگاران قدیم در بین اطبا به طور سنتی کاربرد ضد التهابی داشته است. به نظر می‌رسد همانطور که Edris در سال ۲۰۰٦ و Lavu در سال ۲۰۱۱ اعلام کردند عصاره سیر به دلیل داشتن اثرات ضد اکسیداتیو قوی نقش موثری در کاهش ریسک فاکتور التهابی CRP سرم داشته باشد (۷، ۱۹).

عصاره لیموترش نیز به سبب داشتن مقادیر بالای فلاونوئید، مونوترپن‌ها و فیبر، اثرات ضدالتهابی از خود نشان بدهد (٤، ٦، ۲۹).

با توجه به نتایج حاصل از پژوهش حاضر و با فرض اینکه رفتار CRP رت قابل مقایسه با CRP انسان باشد، احتمال کاهش شاخص CRP در افرادی که از سیر به همراه لیمو استفاده دارویی می‌کنند وجود دارد. از آنجا که این مسأله در پژوهش حاضر نسبتا تایید شده است، می‌توان تحقیقات کلینیکال انسانی را قویا در این خصوص پیشنهاد نمود.

نکته مهم دیگری که باید به آن توجه نمود ارتباط شاخص التهابی CRP و تعداد گلبول‌های سفید است. از آنجا که CRP به واسطه اینترلوکئین‌ها در خون حمل می‌شود و در کمپلکس ضایعه آترومی به همراه گلبول‌های سفید دیده می شود، به نظر می رسد که بین این دو شاخص التهابی بایستی رابطه مثبتی وجود داشته باشد (۲۸).

در ضمن انتظار می‌رفت، تغذیه پرچرب و ایجاد چاقی در حیوانات، شاخص هماتولوژیک التهاب را که همان گلبول‌های سفید هستند افزایش دهد (۵). اما با توجه

به نتایج درج شده در نمودار ۳ رابطه معنی‌داری بین گلبول‌های سفید گروه‌های دریافت کننده عصاره ترکیبی و شم دیده نشده است.

مطلب دیگری که باید به آن اهمیت داد نقش اصلاح کنندگی مواد موثره گیاهان در ترکیب با یکدیگر است. شاید نتایج ضد و نقیضی که در برخی پژوهش‌ها به دست می‌آید با این موضوع مرتبط باشد که خود بر اهمیت پژوهش‌های مستقل بر روی داروهای ترکیبی گیاهی تاکید می‌کند.

از آنجا که مکانیسم عمل بیوشیمیایی بسیاری از ترکیبات موثره هنوز کشف نشده است، انجام تحقیقات *in vitro* بر روی داروهای ترکیبی گیاهی و مقایسه عملکرد آن با عصاره‌های تخلیص شده می تواند نکات عمیق‌تری از اثرات افزاینده یا تعدیل کننده مجاورت ترکیبات دارویی را برای ما آشکار سازد. به طور کلی از نتایج تحقیق حاضر و سایر تحقیقات این طور استنباط می شود که آب و پالپ لیمو تاثیرات متفاوت و گاه متضادی بر شاخص های خونی قلب و عروق داشته باشند که وقتی با هم مصرف می‌شوند خواص همدیگر را اصلاح و تعدیل می‌کنند (۳). همچنین به نظر می‌رسد مکانیسم عمل تاثیر سیر و لیموترش بر بهبود برخی مسائل قلبی عروقی همچون پرفشاری خون بسیار با یکدیگر متفاوت باشد. لذا این خود می‌تواند یک ترکیب دارویی جدید محسوب شود که عوارض جانبی کمتری ایجاد نماید. به طور مثال Odeh و همکارانش در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که سیر فشار خون را در گربه با پایین آوردن ضربان قلب کاهش می‌دهد در حالیکه لیمو این کار را با بالا بردن آن انجام می‌دهد. حال آنکه عصاره ترکیبی این دو گیاه، فشار خون گربه را پایین می‌آورد بدون اینکه تغییری در ضربان قلبی ایجاد نماید (۲۳). همچنین اخیراً مشخص شده است در صورتی که برخی از انواع ترکیبات موجود در گیاهان همراه با سایر ترکیبات موجود در گیاه به مصرف برسد، عوارض جانبی آنها کاهش یافته و تنها اثرات مفید آنها در شخص مشاهده می‌شود. تعدادی از پژوهش‌ها نیز تاثیر آنتی‌اکسیدان‌ها، ویتامین C، کارتنوئیدها و نیز ویتامین E را بر بیماری‌های قلبی عروقی تایید کرده‌اند اما تاکید نموده‌اند که این مکمل-ها به تنهایی نمی‌توانند چنین تاثیراتی را اعمال کنند اما چنانچه در ترکیب با سایر ترکیبات موجود در میوه‌جات و سبزیجات قرار گیرند موثرتر عمل می-کنند.

فلاونوئیدهای طبیعی این خصوص بسیار تاثیرگذار یافت شده‌اند و بسته به اینکه به کدام گروه فیتوکمیکال تعلق دارند ارتباط معکوسی بین مصرف آنها و مشکلات قلبی عروقی دیده شده است. این موضوع را McDowell و همکارانش در سال ۲۰۰۷ اعلام نموده‌اند (۲۱).

با این وجود تحقیقات بلندمدت‌تر و با تجهیزات آزمایشگاهی بهتر و طراحی دقیق‌تر برای پیدا کردن دوز مناسب تاثیرگذار و اثرات بلند مدت داروهای ترکیبی و مسمومیت‌های احتمالی ضروری به نظر می-رسد.

نتیجه‌گیری

عصاره ترکیبی سیر و لیمو قادر است با ضریب اطمینان ۹۹/۹ درصد مقدار کلسترول تام خون را در موش‌های چاق شده کاهش دهد. اما در خصوص CRP این ضریب اطمینان ۹۵ درصد است و احتمال تاثیر استرس های محیطی را نیز باید در نظر گرفت.

تشکر و قدردانی

از دکتر سیاوش احمدی نوربخش برای کمک در اصلاح متدولوژی و نحوه کار با حیوانات آزمایشگاهی، مهندس امین بنی‌نجار مدیر مرکز نگهداری و پرورش حیوانات آزمایشگاه مرکزی

دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، خانم دکتر وجیهه خلیلی به خاطر زحماتی که در آموزش نحوه کار با دستگاه‌ها و تکرار آزمایشات نهایی برای حصول اطمینان از نتایج بدست آمده متقبل شدند و خانم دکتر خاکی و آقای دکتر سیاوشیان در بخش فیزیوپاتولوژی بیمارستان دامپزشکی دانشگاه تهران بخاطر همکاری-های صمیمانه شان تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Assini J.M., Mulvihill E.E., Huff M.W., 2013. Citrus flavonoids and lipid metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, 24(1): 34-40.

2. Banerjee Sanjay K., Maulik Subir K., 2002. Effect of garlic on cardiovascular disorders: a review. *Nutrition Journal*, 1: 1-14.

3. Boshtam M., Naderi G.A., Moshtaghian J., Asgary S., Jafari N., 2009. Effects of Citrus Limon Burm F. on some atherosclerosis risk factors in rabbits with atherogenic diet. *ARYA Atherosclerosis Journal*, 5(2): 89-94.

4. Chanet A., Milenkovic D., Deval C., Potier M., Constans J., Mazur A., Bennetau-Pelissero C., Morand C., Bérard A.M., 2012. Naringin, the major grapefruit flavonoid, specifically affects atherosclerosis development in diet-induced hypercholesterolemia in mice. *Journal of Nutrition and Biochemistry*, 23(5): 469-477.

5. Chen S.B., Lee Y.C., Ser K.H., Chen J.C., Chen S.C., Hsieh H.F., Lee W.J., 2009. Serum C-reactive protein and white blood cell count in morbidly obese surgical patients. *Obesity Surgery*, 19(4): 461-466.

6. de Cássia da Silveira e Sá R., Andrade L.N., de Sousa D.P., 2013. A Review on Anti-Inflammatory Activity of Monoterpenes. *Molecules*, 18: 1227-1254.

7. Edris A.E., 2007. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents, A review. *Phytotherapy Research*, 21(4): 308-323.

8. Fruchart J.C., Nierman M.C., Stroes E.S.G., Kastelein J.J.P., Duriez P., 2004. New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment. *Circulation*, 109 III: 15-19.

9. Gajda A.M., 2008. Obesity high fat diets for diet-induced obesity models, a brief review of the scientific literature. Research Diets Inc.

10. Gajda A.M., Pellizzon M.A., Ricci M.R., Ulman E.A., 2007. Diet-Induced metabolic syndrome in rodent models. *Animal Lab News*, 7: 195-200.

11. Habauzit V., Morand C., 2012. Evidence for a protective effect of polyphenols-containing foods on cardiovascular health: an update for clinicians. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*, 3(2): 87-106.

12. Jepson R.G., Kleijnen J., Leng G.C., 2013. Garlic for peripheral arterial occlusive disease. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 4: 95.

13. Kalsait R.P., Khedekar P.B., Saoji A.N., Bhusari K.P., 2011. Role of C-reactive protein in the Development of Atherosclerosis in Diet-induced Lipidemia in Albino Rats. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 10(1): 41-45.

14. Kaptoge S., Angelantonio E.D., Pennells L., 2012. C-reactive protein, fibrinogen, and cardiovascular disease prediction, the emerging risk factors collaboration. *New England Journal of Medicine*, 367: 1310-1320.

15. Khan Y., Rafeeq A.K., Afroz S., Siddiq A., 2010. Evaluation of hypolipidemic effect of citrus lemon. *Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(1): 39-43.

16. König G.M., Wright A.D., Keller W.J., Judd R.L., Bates S., Day C., 2007. Hypoglycaemic Activity of an HMG-Containing Flavonoid Glucoside,

Chamaemeloside, from Chamaemelum nobile. *Planta Medicina*, 64(7): 612-614.

17. Kris-Etherton P.M., Hecker K.D., Bonanome A., Coval S.M., Binkoski A.E., Hilpert K.F., Griel A.E., Etherton T.D., 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, 30: 113: 71S-88S.

18. Last W., 2013. Cardiovascular disease and the cholesterol saga. http://www.health-science-spirit.com/cholesterol.html.

19. Lavu M., Bhushan S., Lefer D.J., 2011. Hydrogen sulfide-mediated cardio protection: mechanisms and therapeutic potential. *Clinical Science*, 120: 219-229.

20. Leopoldo A.S., Sugizaki M.M., Lima-Leopoldo A.P., do Nascimento A.F., Luvizotto R.A.M., de Campos D.H.S., Okoshi K., Pai-Silva M.D., Padovani C.R., Cicogna A.C., 2010. Cardiac remodeling in a rat model of diet-induced obesity. *Canadian Journal of Cardiology*, 26(8): 423-429.

21. Manner Whistler W.A., Elevitch C.R., 2006. Species profiles for Pacific Island Agroforestry. ww.traditionaltree.org. April. ver. 2.1.

22. 21McDowell D., Maloney M., Swan L., Erwin P., Gormley R., McKee R., Briggs M., 2007. A review of the fruit and vegetable food chain, consumer focused review of the fruit and vegetable food chain. *Safe Foods*, 102 pp.

23. Neil D., McKay D., 2003. Guidelines on: laboratory animal facilities characteristics, design and development. Canadian Council on Animal Care, Ottawa, Canada, 108 pp.

24. Odeh S.O., Adelaiye A.B., Ibu J.O., 2013. Some effects of the administration of the combination of *Allium sativum* (Garlic) and *Citrus aurantifolia* (acid lime) on blood pressure in normotensive cats. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(11): 624-628.

25. 24 Orekhov A.N., 2013. Direct Anti-Atherosclerotic Therapy; Development of Natural Anti-Atherosclerotic Drugs Preventing Cellular Cholesterol Retention. *Current Pharmacological Design*, 14(3): 233-240

26. Rahman K., Lowe G.M., 2006. Significance of Garlic and Its Constituents in Cancer and Cardiovascular Disease. *Journal of Nutrition*, 136: 736S-740S,

27. Sarrafzadeh-Rezaei F., Ahmadi-Noorbakhsh S., 2010. Management, Anesthesia and Surgery of Laboratory Animals. Urmia University Publication, 880 pp.

28. Singh S.K., Suresh M.V., Voleti B., Agrawal A., 2008. The connection between C-reactive protein and atherosclerosis. *Annual Medicine*, 40(2): 110-120.

29. Tanaka T., Yasui Y., Ishigamori-Suzuki R., Takeru O., 2008. Citrus Compounds Inhibit Inflammation and Obesity-Related Colon Carcinogenesis in Mice. *Nutrition and Cancer*, 60(S1): 70–80.

30. Ulbricht C., Basch E., Basch S., Bryan J.K., 2010. An Evidence-based review of garlic and its hypolipidemic properties by the natural standard research collaboration. Scientific evidence for common/studied uses. *Natural Medicine Journal*, 2(4): 1-7.

31. Van Doorn M.B., Espirito Santo S.M., Meijer P., Kamerling I.M., Schoemaker R.C., Dirsch V., Vollmar A., Haffner T., Gebhardt R., Cohen A.F., Princen H.M., Burggraaf J., 2006. Effect of garlic powder on C-reactive protein and plasma lipids in overweight and smoking subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 84(6): 1324-1329.

32. Yaghmai P., Parivar K., Haftsavar M., 2011. Effects of Citrus aurantifolia peel essential oil on serum cholesterol levels in Wistar rats. *Journal of Paramedical Sciences*, 2(1): 29-32.