

اثر محافظتی کاپتوپریل در برابر اثرات سوء ناشی از پرتو گاما بر سلول‌های مغز استخوان موش با آزمون میکرونوکلئوس

شهرام اخلاق پور (M.D.)***

عزیز محمود زاده (M.Sc.)**

سیدجلال حسینی مهر (Ph.D.)*

چکیده

سابقه و هدف: پرتوهای یونیزان با عبور از سلول‌ها ایجاد رادیکال‌های آزاد می‌کنند که این رادیکال‌های آزاد به ماکرومولکول‌های حیاتی مثل DNA و غشاء سلول برخورد کرده و منجر به آسیب سلولی و نهایتاً عوارض سوء روی دستگاه‌های زیست-شناختی می‌شوند. ترکیباتی که خاصیت آنتی‌اکسیدانی داشته باشند با خنثی کردن اثرات رادیکال‌های آزاد موجب کاهش اثرات مخرب اشعه می‌شوند. در این مطالعه اثر محافظت پرتوی کاپتوپریل با آزمون میکرونوکلئوس برای ارزیابی اثرات ضد کلاستورژنیکس (Anticlastogenic) و تکثیر سلولی در مغز استخوان موش مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: کاپتوپریل به صورت داخل صفاقی (ip) در مقادیر 10، 25 و 50 میلی‌گرم یکساعت قبل از اشعه گاما (2گری) تزریق شد. حیوانات پس از 24 ساعت کشته و نمونه‌هایی از مغز استخوان تهیه و رنگ آمیزی شده و میزان ریز هسته در سلول‌های پلی کروماتیک اریتروسیت (PCE) و نرموکروماتیک اریتروسیت (NCE) با میکروسکوپ شمارش شدند. اثر آنتی‌اکسیدانی کاپتوپریل با آزمون دی فنیل پیکریل هیدرازیل مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: هر سه مقدار تجویزی میزان MnPCE را کاهش داده و همچنین نسبت PCE/(PCE+NCE) را افزایش داده است که این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.001$). مقدار مناسب کاپتوپریل برای محافظت در موش 10 mg/kg می‌باشد که مغز استخوان را به میزان 2/18 برابر در برابر اثر کلاستورژنیکس اشعه محافظت کرده است. در این مطالعه کاپتوپریل اثر آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی داشت؛ به طوری که در غلظت 0/2mM بیش از 96% اثر مهار رادیکال آزاد داشته است.

استنتاج: نتایج این تحقیق نشان داد که کاپتوپریل احتمالاً با مکانیسم آنتی‌اکسیدانی موجب حذف اثر تخریبی رادیکال‌های آزاد ناشی از پرتوهای یونساز روی سلول‌های مغز استخوان شده و آسیب ژنتیکی را کاهش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: محافظ پرتو، کاپتوپریل، آزمون میکرونوکلئوس، اشعه گاما

مقدمه

پرتوهای یونیزان کاربرد فراوانی در علوم مختلف از جمله پزشکی دارند یکی از روش‌های به کارگیری اثرات پرتوها روی سلول‌ها، استفاده از رادیوتراپی در درمان تومورها است، اما اشعه علاوه بر از بین بردن

E این تحقیق طی شماره 35-83 در شورای پژوهشی دانشگاه ثبت شده و با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شده است.

* متخصص داروسازی هسته‌ای، عضو هیأت علمی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران * ساری: کیلومتر 18 خزرآباد - مجتمع دانشگاه علوم پزشکی مازندران - دانشکده داروسازی

** کارشناس ارشد هماتولوژی، عضو هیات علمی (مربی) انستیتو پرتو پزشکی نوین تهران *** متخصص رادیولوژی (استاد یار) دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
E تاریخ دریافت: 84/3/22 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 84/5/3 تاریخ تصویب: 84/9/30

مغز استخوان با استفاده از آزمون معتبر میکرونوکلئوس مورد ارزیابی قرار گرفته است. میکرونوکلئای یا ریز هسته‌ها در واقع تکه‌های کروموزومی هستند که در طی فرایند میتوزی، به سلول حاصل از تقسیم منتقل نشده و در سیتوپلاسم سلول مادر باقی می‌مانند. میکرونوکلئای از سال 1975 تا کنون به‌عنوان آزمون معتبر برای بررسی آسیب‌های ژنتیکی ناشی از پرتوهای یونیزان عوامل شیمیایی به فراوانی مورد استفاده قرار می‌گیرد (کو 6).

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی:

پودر داروی کاپتوپریل با خلوص دارویی از شرکت داروپخش ایران تهیه شده است. دی فنیل پیکریل هیدرازیل از شرکت ICN (آمریکا)، هیدروکسی تولون بوتیل، مای گرانولا، گیمسا و حلال‌های مورد استفاده از شرکت مرک خریداری شده است.

حیوان

در این مطالعه از موش‌های سوری نر NMRI با وزن 3 تا 25 گرم که از موسسه سرم سازی رازی کرج- ایران خریداری شده است، استفاده شده است. حیوانات در حیوانخانه در شرایط مناسب دما و نور نگهداری شدند. موش‌ها به شش گروه 5 تایی تقسیم و مورد مطالعه قرار گرفتند. گروه‌های مورد مطالعه شامل گروه کنترل، گروه پرتو تنها، گروه‌های کاپتوپریل با مقادیر مختلف (10، 20 و 50 میلی‌گرم / کیلوگرم) همراه با پرتو و گروه کاپتوپریل تنها بودند.

تجویز دارو و پرتو دهی

سلول‌های توموری موجب اثرات سوء روی سلول‌های طبیعی نیز می‌شود، لذا دستیابی به داروی محافظ پرتو (Radioprotective agent) برای کاهش عوارض سوء ناشی از رادیوتراپی مورد توجه است (1).

علاوه بر کاربرد محافظ پرتو‌ها در مقاصد پزشکی و درمانی، افراد جامعه می‌توانند به‌نوعی تحت تاثیر عوارض سوء ناشی از اشعه قرار گیرند. لذا با توجه به عوارض حاصل از پرتو، محققین در پی یافتن داروهایی هستند که این آسیب‌ها را تعدیل کنند. در این راستا ترکیبات زیادی تهیه و مورد ارزیابی محافظت پرتوی قرار گرفتند که عمدتاً ترکیبات حاوی گروه سولفور می‌باشند که با خاصیت به‌دام انداختن رادیکال‌های آزاد موجب کاهش اثرات رادیکال‌های آزاد ناشی از اشعه روی دستگاه زیست-شناختی می‌شوند (1 و 2). یکی از اندام‌هایی که به اشعه خیلی حساس است، مغز استخوان می‌باشد. اشعه موجب کاهش فعالیت آن و کاهش سلول‌های پیش‌ساز خونی و همچنین آسیب ژنتیکی در مغز استخوان می‌شود، به‌طوری‌که عوارض ناشی از اشعه روی مغز استخوان که عضوی حیاتی می‌باشد در مقادیر بالا منجر به مرگ فوری می‌شود لذا محافظت دارویی از این عضو جزء اولویت‌های حفاظتی در برابر اشعه محسوب می‌گردد (1). کاپتوپریل دارویی است که برای کاهش فشارخون مورد استفاده قرار می‌گیرد. از خواص دیگر این دارو اثر آنتی اکسیدانی آن می‌باشد که می‌تواند رادیکال‌های آزاد را خنثی کند (3). مطالعه قبلی نشان‌گر این بود که کاپتوپریل اثر محافظتی روی ژنوم موش داشته است (4). با توجه به اهمیت و حساسیت مغز استخوان در برابر پرتوهای یونیزان و عدم بررسی اثر محافظتی کاپتوپریل روی این اندام حیاتی، در این مطالعه اثر محافظت پرتوی کاپتوپریل در برابر عوارض سوء ناشی از اشعه گاما در

کاپتوپریل را در نرمال سالین حل کرده و مقادیر مختلف دارو به روش داخل صفاق (ip) به موش‌ها در گروه‌های 5 تایی توسط سرنگ انسولین تزریق شد. برای پرتودهی، از دستگاه رادیوتراپی مرکز پرتو پزشکی نوین واقع در تهران استفاده شد. چشمه گاما دهنده، کبالت 60 و مدل دستگاه Teratron 780 بود. فاصله منبع تابش تا سطح پوست 80cm و آهنگ مقدار پرتودهی (Dose Rate) 1/35 cGy/min بود. موش‌ها در گروه‌های 5 تایی در قفس پرتو دهی از جنس فایبر گلاس قرار گرفته و به میزان 2 گری تحت تابش قرار گرفتند.

آزمون میکرونوکلئوس

آزمون میکرونوکلئوس در مغز استخوان موش طبق روش اشمید صورت گرفت (5و6). 24 ساعت بعد از پرتودهی، موش‌ها به روش جابه‌جایی گردنی (cervical dislocation) کشته شدند. سپس هر دو استخوان فمور آن‌ها خارج شده سپس با یک سی‌سی سرم جنین گاوی FCS به وسیله سرنگ انسولین محتویات مغز استخوان از انتهای زیرین فمور خارج شده و درون لوله آزمایش جمع آوری شد. برای هر موش، مغز استخوان هر دو فمور در یک لوله آزمایش استخراج شد. سپس لوله‌های آزمایش به مدت 10 دقیقه با دور 2000rpm سانتریفوژ شدند نمونه‌های مغز استخوان که از یک لوله به دست آمده بود روی لام‌ها منتقل شده و لام‌ها به مدت 24 ساعت در هوای آزاد فیکس شده، سپس با محلول رنگی مای گرانوالد و گیمسا رنگ‌آمیزی شدند. برای هر گروه 5 سر موش انتخاب کرده و سلول‌های فوق با میکروسکوپ نوری شمارش شدند. تعداد 1000 سلول پلی کروماتیک اریتروسیت برای هر موش شمارش شدند. در این آزمون PCE (پلی-کروماتیک اریتروسیت) به رنگ بنفش و NCE (نروکروماتیک اریتروسیت) به رنگ زرد مشاهده شد.

بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانتی
توانایی به‌دام اندازی رادیکال آزاد کاپتوپریل با استفاده از رادیکال آزاد پایدار دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) انجام شد (7). غلظت‌های مختلف از کاپتوپریل (0/02 تا 0/2 میلی مول) در اتانول حل شد و با حجم‌های یکسان به محلول اتانولی (100 μm) DPPH اضافه شد. مخلوط در درجه حرارت اتاق قرار گرفته و پس از 15 دقیقه، جذب UV آن در طول موج 517 نانومتر در مقابل شاهد اتانول خوانده شد. آنتی‌اکسیدانت تجارتي BHT (هیدروکسی تولوئن بوتیل) به‌عنوان استاندارد در نظر گرفته شد. هر آزمایش سه بار تکرار شد.

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) و به‌دنبال آن با استفاده از آزمون چندگانه Tukey HSD صورت گرفت.

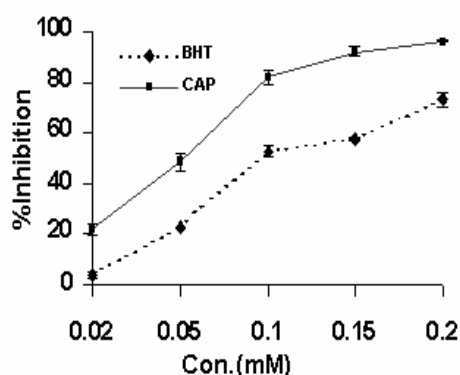
یافته‌ها

تاثیر کاپتوپریل روی میزان MnPCE القاء شده توسط اشعه گاما

نتایج حاصل از تاثیر کاپتوپریل روی کاهش درصد ریز هسته در سلول‌های مغز استخوان در جدول 1 آمده است. اشعه گاما به عنوان عامل سیتوژنتیک موجب افزایش درصد ریز هسته در سلول‌های پیش ساز خونی به میزان 9/65 درصد شده است و تفاوت فراوانی ریز هسته‌ها در گروه تابش دیده با گروه شاهدی که فقط حلال دریافت کردند از لحاظ آماری معنی دار می‌باشد (p<0.0001). گروه‌هایی از موش که کاپتوپریل را در مقادیر 10 و 25 و 50 میلی گرم بر کیلوگرم ،

فعالیت آنتی اکسیدانی

روش به دام اندازی رادیکال آزاد با DPPH برای بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات گیاهی و سنتتیک به فراوانی به کار می‌رود. نتایج آنتی اکسیدانی کاپتوپریل در نمودار 1 نشان داده شده است. کاپتوپریل با خاصیت آنتی اکسیدانی موجب کاهش میزان رادیکال آزاد DPPH شده است. این اثر آنتی اکسیدانی وابسته به غلظت می باشد و با افزایش غلظت، میزان درصد به دام اندازی رادیکال‌های آزاد افزایش یافته است. کاپتوپریل با غلظت 0/2mM موجب مهار 96 درصد رادیکال آزاد شده است. BHT به عنوان آنتی اکسیدان استاندارد در همان غلظت به کار رفته است. در تمام غلظت‌های مولی به کار رفته، کاپتوپریل اثر آنتی اکسیدانی بیش تری نسبت به BHT داشته است ($p < 0.01$).



نمودار شماره 1: خاصیت آنتی اکسیدانی کاپتوپریل (CAP) و هیدروکسی تولوئن بوتیل (BHT) در غلظت‌های 0/02 تا 0/2 میلی مول با روش DPPH و اسپکتروفتومتری در طول موج 517 نانومتر. هر آزمایش سه بار تکرار شده است.

یک ساعت قبل از تابش گاما به میزان 2 گری دریافت کردند، کاهش میزان ریز هسته در سلول‌های PCE به ترتیب 4/43، 4/10 و 6/20 می‌باشد ($p < 0.0001$). هر چند میزان کاهش ریز هسته با افزایش مقدار دارو از 25mg/kg کاپتوپریل کمتر از 10mg/kg بود ولی این اختلاف از لحاظ آماری معنی دار نبود. نسبت $PCE/(PCE+NCE)$ %

در گروه کنترل 61/6 درصد و در گروه پرتو دیده با 2 گری اشعه گاما 38/3 درصد می باشد و از لحاظ آماری این اختلاف معنی دار می باشد ($p < 0.0001$). تجویز کاپتوپریل در مقادیر 10 و 25 و 50 میلی گرم بر کیلوگرم موجب افزایش معنی دار این نسبت شده است؛ به طوری که با افزایش دز از 10 به 25mg/kg نسبت $PCE/(PCE+NCE)$ % به طور معنی داری افزایش یافته است ($p < 0.001$) و با افزایش مقدار به 50mg/kg این افزایش معنی دار نمی باشد. کاپتوپریل در مقدار 50mg/kg هیچ گونه اثر کلاستوزنیک و سمی نداشته است. کاپتوپریل در مقادیر 10 و 25 و 50 میلی گرم بر کیلوگرم موجب کاهش درصد ریز هسته با فاکتور 2/18 و 2/35 و 1/55 در مقایسه با گروهی که فقط اشعه دریافت کرده، می شود

جدول شماره 1: تاثیر کاپتوپریل روی ایجاد ریز هسته ناشی از اشعه در سلول‌های PCE و نسبت $PCE/(PCE+NCE)$ % در مغز استخوان موش‌های پرتو دیده با 2 گری اشعه گاما

گروه	نوع تیمار	MnPCE/PCE (%)	PCE/(PCE+NCE) (%)
1	شاهد	1/05 ± 0/13	61/63 ± 1/49
2	اشعه	9/65 ± 0/98	38/28 ± 1/09
3	اشعه + کاپتوپریل 10 mg/Kg	4/43 ± 0/26	44/18 ± 1/19
4	اشعه + کاپتوپریل 25 mg/Kg	4/10 ± 0/30	53/33 ± 2/08
5	اشعه + کاپتوپریل 50 mg/Kg	6/20 ± 0/46	53/63 ± 2/76
6	کاپتوپریل 50 mg/Kg	0/94 ± 0/07	62/0 ± 2/65

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که کاپتوپریل عوارض سیتوژنتیکی ناشی از اشعه را در سلول‌های مغز استخوان موش کاهش داده است. اثر محافظتی کاپتوپریل روی سمیت ژنتیکی ناشی از اشعه با تعیین میزان MnPCE در سلول‌های مغز استخوان، 24 ساعت پس از تجویز دارو ارزیابی شد. در این مطالعه، تجویز تک دز کاپتوپریل به صورت داخل صفاقی تشکیل ریز هسته ناشی از اشعه را کاهش داده است. کاپتوپریل با کاهش میزان MnPCE اثر ضد کلاستوژنتیکی بر روی عوارض جانبی اشعه داشته است. کاپتوپریل میزان نسبت $PCE/PCE+NCE$ % که توسط اشعه کاهش پیدا کرده بود را به طور قابل توجه افزایش داده است. پرتوهای یونساز رادیکال‌های آزاد تولید می‌کنند که منجر به آسیب به DNA و القاء عوارض ژنتیکی و مرگ در سلول می‌شود (8). به دام اندازی رادیکال‌های فعال یکی از مهم‌ترین روش‌های ضد جهش در ژن و ضد سرطان است (9). در مطالعه قبلی ما نشان دادیم که عصاره پوست نارنج با خاصیت آنتی‌اکسیدانی هنگامی که قبل از پرتو-دهی به موش تجویز شود مغز استخوان را به طور قابل توجهی محافظت می‌کند (5). در مطالعه حاضر کاپتوپریل خاصیت آنتی‌اکسیدانی خوبی داشته است. بنابر این اثر محافظتی کاپتوپریل در برابر اثر کلاستوژنتیکی ناشی از اشعه گاما می‌تواند به دلیل خاصیت به دام اندازی رادیکال‌های آزاد این دارو باشد. کاپتوپریل در ساختار مولکولی خودش دارای گروه SH است که نقش آنتی‌اکسیدانی دارد. تجویز کاپتوپریل به میزان 10 mg/kg به موش قبل از تابش 2 گری اشعه گاما میزان ریز هسته در سلول‌های PCE را 2/18 برابر کاهش داده است. در بین محافظ‌های پرتوی، آمیغوستین به عنوان محافظ پرتو قوی شناخته شده است اما این دارو برای اثر بخشی خود لازم است در مقادیر بالا تجویز

شود که این میزان تجویزی نزدیک به میزان سمی می‌باشد (2/3 دز LD_{50}) و موجب عوارض جانبی می‌شود (10). در این مطالعه نشان داده شد که کاپتوپریل به میزان 10mg/kg موش را محافظت می‌کند و این مقدار خیلی کوچکتر از LD_{50} این دارو است (تجویز iv، میزان $LD_{50} > 1600$ mg/kg است) (11). در تحقیقات قبلی نشان داده شد که کاپتوپریل موکوس ژنوم و قلب موش را در برابر آسیب حاد ناشی از اشعه محافظت می‌کند. مکانیسم محافظتی کاپتوپریل در سمیت قلبی ناشی از اشعه مربوط به سیتوکین‌ها می‌باشد (4 و 12). کاپتوپریل فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد که به خاطر حضور گروه تیول در ساختار آن می‌باشد. این دارو هم‌چنین به دلیل قابلیت کمپلکس شدن با فلزات و افزایش دادن فعالیت آنزیم سوپر اکسید دسموتاز نقش آنتی‌اکسیدانی خود را اعمال می‌کند تجویز کاپتوپریل به حیوانات موجب افزایش میزان گلوکوتایون در بافت‌های مختلف شده است که افزایش گلوکوتایون همراه با افزایش میزان آنزیم سوپر اکسید دسموتاز موجب افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانی کاپتوپریل در شرایط استرس می‌شود (3، 13، 14).

کاپتوپریل به خاطر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و به دام اندازی رادیکال‌های آزاد ناشی از اشعه موجب کاهش اثرات تخریبی پرتوهای یونساز روی مولکول‌های حیاتی مانند DNA می‌شود و آسیب ژنتیکی ناشی از اشعه را روی مغز استخوان کاهش می‌دهد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از زحمات آقای دکتر زحمت‌کش که پرتودهی حیوانات را انجام دادند و همچنین از سرکار خانم محمدی فر در انستیتو پرتو پزشکی نوین که در انجام این طرح به ما یاری رساندند تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

فهرست منابع

2. Bump E, Malaker K. *Radioprotectors, Chemical, Biological and Clinical perspectives*. CRC press LLC, Boca Raton, Florida; 1997. P 15-18.
3. Lapenna D. The prooxidant properties of captopril. *Biochemical Pharmacology*; 1995; 50: 27-32.
4. Yoon SC. Radioprotective effect of captopril on the mouse jejunal mucosa. *Int. J. Radiat.oncol. Biol. Phys.* 1994; 30: 873-878.
5. Hosseinimehr SJ, Tavakoli H, Pourhediadri GR, Sobhai AG, Shafiee A. Radioprotective effects of citrus extract against gamma irradiation in mouse bone marrow cell. *J. Radiat. Res.* 2003; 44; 237-241.
6. Schmid W. The micronucleus test. *Mutation Res* 1975; 31: 9-15.
7. Koleva I, Van BEEK TA, Linssen J.P.H. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Anal.* 2002; 13: 8-17.
8. Reily PA. Free radicals in biology: oxidative stress and the effect of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol.* 1994; 65: 27-33
9. Tiwari AK. Imbalance in antioxidant defense and human diseases: multiple approach of natural antioxidants therapy. *Curr Sci.* 2001; 81: 1179-1187.
10. Mazur L. Radioprotective effects of the thiols GSH and WR-2721 against X-ray-induction of micronuclei in erythroblasts. *Mutation Res.* 2000; 468: 27-33.
11. Imai K, Hayashi Y, Hashimoto K. Acute toxicological studies of captopril in rats and mice. *J Toxicol Sci.* 1981; 6 Suppl 2: 179-88.
12. Chang SH, Lee KJ, Koo H. The Radioprotective Effect and Mechanism of Captopril on Radiation Induced-Heart Damage in Rats. *J Korean Soc Ther Radiol Oncol.* 2004; 22(1): 40-54.
13. Bartosz M, Kedziora J, Bartosz G. Antioxidant and prooxidant properties of captopril and enalapril. *Free Rad and Biol Med.* 1997; 23 : 729-735.
14. Jay D, Garcia EJ, Aviala MC, Munoz E. Superoxide-Superoxide oxidoreductase activity of the captopril-copper complex. *Arch. Medicine Res.* 2002; 33: 115-122.
1. کانکلین جمیر، جی، والکر ریچارد، آی، عواقب انفجارهای اتمی از دیدگاه پزشکی. م. دکتر حسین مزدارانی چاپ اول. دانشگاه امام حسین (ع) تهران، 1374.

اثر محافظتی کاپتوپریل در برابر اثرات سوء ناشی از پرتو گاما بر سلول‌های مغز استخوان موش با آزمون میکرونوکلئوس

شهرام اخلاق پور (M.D.)***

عزیز محمود زاده (M.Sc.)**

سیدجلال حسینی مهر (Ph.D.)*

چکیده

سابقه و هدف: پرتوهای یونیزان با عبور از سلول‌ها ایجاد رادیکال‌های آزاد می‌کنند که این رادیکال‌های آزاد به ماکرومولکول‌های حیاتی مثل DNA و غشاء سلول برخورد کرده و منجر به آسیب سلولی و نهایتاً عوارض سوء روی دستگاه‌های زیست-شناختی می‌شوند. ترکیباتی که خاصیت آنتی‌اکسیدانی داشته باشند با خنثی کردن اثرات رادیکال‌های آزاد موجب کاهش اثرات مخرب اشعه می‌شوند. در این مطالعه اثر محافظت پرتوی کاپتوپریل با آزمون میکرونوکلئوس برای ارزیابی اثرات ضد کلاستورژنیکس (Anticlastogenic) و تکثیر سلولی در مغز استخوان موش مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: کاپتوپریل به صورت داخل صفاقی (ip) در مقادیر 10، 25 و 50 میلی‌گرم یکساعت قبل از اشعه گاما (2گری) تزریق شد. حیوانات پس از 24 ساعت کشته و نمونه‌هایی از مغز استخوان تهیه و رنگ آمیزی شده و میزان ریز هسته در سلول‌های پلی کروماتیک اریتروسیت (PCE) و نرموکروماتیک اریتروسیت (NCE) با میکروسکوپ شمارش شدند. اثر آنتی‌اکسیدانی کاپتوپریل با آزمون دی فنیل پیکریل هیدرازیل مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: هر سه مقدار تجویزی میزان MnPCE را کاهش داده و همچنین نسبت PCE/(PCE+NCE) را افزایش داده است که این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.001$). مقدار مناسب کاپتوپریل برای محافظت در موش 10 mg/kg می‌باشد که مغز استخوان را به میزان 2/18 برابر در برابر اثر کلاستورژنیکس اشعه محافظت کرده است. در این مطالعه کاپتوپریل اثر آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی داشت؛ به طوری که در غلظت 0/2mM بیش از 96% اثر مهار رادیکال آزاد داشته است.

استنتاج: نتایج این تحقیق نشان داد که کاپتوپریل احتمالاً با مکانیسم آنتی‌اکسیدانی موجب حذف اثر تخریبی رادیکال‌های آزاد ناشی از پرتوهای یونساز روی سلول‌های مغز استخوان شده و آسیب ژنتیکی را کاهش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: محافظ پرتو، کاپتوپریل، آزمون میکرونوکلئوس، اشعه گاما

مقدمه

پرتوهای یونیزان کاربرد فراوانی در علوم مختلف از جمله پزشکی دارند یکی از روش‌های به کارگیری اثرات تومورهاست، اما اشعه علاوه بر از بین بردن

E این تحقیق طی شماره 35-83 در شورای پژوهشی دانشگاه ثبت شده و با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شده است.

* متخصص داروسازی هسته‌ای، عضو هیأت علمی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران + * ساری: کیلومتر 18 خزرآباد - مجتمع دانشگاه علوم پزشکی مازندران - دانشکده داروسازی

** کارشناس ارشد هماتولوژی، عضو هیات علمی (مربی) انستیتو پرتو پزشکی نوین تهران *** متخصص رادیولوژی (استاد یار) دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
E تاریخ دریافت: 84/3/22 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 84/5/3 تاریخ تصویب: 84/9/30

مغز استخوان با استفاده از آزمون معتبر میکرونوکلئوس مورد ارزیابی قرار گرفته است. میکرونوکلئای یا ریز هسته‌ها در واقع تکه‌های کروموزومی هستند که در طی فرایند میتوزی، به سلول حاصل از تقسیم منتقل نشده و در سیتوپلاسم سلول مادر باقی می‌مانند. میکرونوکلئای از سال 1975 تا کنون به‌عنوان آزمون معتبر برای بررسی آسیب‌های ژنتیکی ناشی از پرتوهای یونیزان عوامل شیمیایی به فراوانی مورد استفاده قرار می‌گیرد (کو 6).

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی:

پودر داروی کاپتوپریل با خلوص دارویی از شرکت داروپخش ایران تهیه شده است. دی فنیل پیکریل هیدرازیل از شرکت ICN (آمریکا)، هیدروکسی تولون بوتیل، مای گرانولا، گیمسا و حلال‌های مورد استفاده از شرکت مرک خریداری شده است.

حیوان

در این مطالعه از موش‌های سوری نر NMRI با وزن 3 تا 25 گرم که از موسسه سرم سازی رازی کرج - ایران خریداری شده است، استفاده شده است. حیوانات در حیوانخانه در شرایط مناسب دما و نور نگهداری شدند. موش‌ها به شش گروه 5 تایی تقسیم و مورد مطالعه قرار گرفتند. گروه‌های مورد مطالعه شامل گروه کنترل، گروه پرتو تنها، گروه‌های کاپتوپریل با مقادیر مختلف (10، 20 و 50 میلی‌گرم / کیلوگرم) همراه با پرتو و گروه کاپتوپریل تنها بودند.

تجویز دارو و پرتو دهی

سلول‌های توموری موجب اثرات سوء روی سلول‌های طبیعی نیز می‌شود، لذا دستیابی به داروی محافظ پرتو (Radioprotective agent) برای کاهش عوارض سوء ناشی از رادیوتراپی مورد توجه است (1).

علاوه بر کاربرد محافظ پرتو‌ها در مقاصد پزشکی و درمانی، افراد جامعه می‌توانند به‌نوعی تحت تاثیر عوارض سوء ناشی از اشعه قرار گیرند. لذا با توجه به عوارض حاصل از پرتو، محققین در پی یافتن داروهایی هستند که این آسیب‌ها را تعدیل کنند. در این راستا ترکیبات زیادی تهیه و مورد ارزیابی محافظت پرتوی قرار گرفتند که عمدتاً ترکیبات حاوی گروه سولفور می‌باشند که با خاصیت به‌دام انداختن رادیکال‌های آزاد موجب کاهش اثرات رادیکال‌های آزاد ناشی از اشعه روی دستگاه زیست-شناختی می‌شوند (1 و 2). یکی از اندام‌هایی که به اشعه خیلی حساس است، مغز استخوان می‌باشد. اشعه موجب کاهش فعالیت آن و کاهش سلول‌های پیش‌ساز خونی و همچنین آسیب ژنتیکی در مغز استخوان می‌شود، به‌طوری‌که عوارض ناشی از اشعه روی مغز استخوان که عضوی حیاتی می‌باشد در مقادیر بالا منجر به مرگ فوری می‌شود لذا محافظت دارویی از این عضو جزء اولویت‌های حفاظتی در برابر اشعه محسوب می‌گردد (1). کاپتوپریل دارویی است که برای کاهش فشارخون مورد استفاده قرار می‌گیرد. از خواص دیگر این دارو اثر آنتی‌اکسیدانی آن می‌باشد که می‌تواند رادیکال‌های آزاد را خنثی کند (3). مطالعه قبلی نشان‌گر این بود که کاپتوپریل اثر محافظتی روی ژنوم موش داشته است (4). با توجه به اهمیت و حساسیت مغز استخوان در برابر پرتوهای یونیزان و عدم بررسی اثر محافظتی کاپتوپریل روی این اندام حیاتی، در این مطالعه اثر محافظت پرتوی کاپتوپریل در برابر عوارض سوء ناشی از اشعه گاما در

کاپتوپریل را در نرمال سالین حل کرده و مقادیر مختلف دارو به روش داخل صفاق (ip) به موش‌ها در گروه‌های 5 تایی توسط سرنگ انسولین تزریق شد. برای پرتودهی، از دستگاه رادیوتراپی مرکز پرتو پزشکی نوین واقع در تهران استفاده شد. چشمه گاما دهنده، کبالت 60 و مدل دستگاه Teratron 780 بود. فاصله منبع تابش تا سطح پوست 80cm و آهنگ مقدار پرتودهی (Dose Rate) 1/35 cGy/min بود. موش‌ها در گروه‌های 5 تایی در قفس پرتو دهی از جنس فایبر گلاس قرار گرفته و به میزان 2 گری تحت تابش قرار گرفتند.

آزمون میکرونوکلئوس

آزمون میکرونوکلئوس در مغز استخوان موش طبق روش اشمید صورت گرفت (5و6). 24 ساعت بعد از پرتودهی، موش‌ها به روش جابه‌جایی گردنی (cervical dislocation) کشته شدند. سپس هر دو استخوان فمور آن‌ها خارج شده سپس با یک سی‌سی سرم جنین گاوی FCS به وسیله سرنگ انسولین محتویات مغز استخوان از انتهای زیرین فمور خارج شده و درون لوله آزمایش جمع آوری شد. برای هر موش، مغز استخوان هر دو فمور در یک لوله آزمایش استخراج شد. سپس لوله‌های آزمایش به مدت 10 دقیقه با دور 2000rpm سانتریفوژ شدند نمونه‌های مغز استخوان که از یک لوله به دست آمده بود روی لام‌ها منتقل شده و لام‌ها به مدت 24 ساعت در هوای آزاد فیکس شده، سپس با محلول رنگی مای گرانوالد و گیمسا رنگ‌آمیزی شدند. برای هر گروه 5 سر موش انتخاب کرده و سلول‌های فوق با میکروسکوپ نوری شمارش شدند. تعداد 1000 سلول پلی کروماتیک اریتروسیت برای هر موش شمارش شدند. در این آزمون PCE (پلی-کروماتیک اریتروسیت) به رنگ بنفش و NCE (نروکروماتیک اریتروسیت) به رنگ زرد مشاهده شد.

بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانتی
توانایی به‌دام اندازی رادیکال آزاد کاپتوپریل با استفاده از رادیکال آزاد پایدار دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) انجام شد (7). غلظت‌های مختلف از کاپتوپریل (0/02 تا 0/2 میلی مول) در اتانول حل شد و با حجم‌های یکسان به محلول اتانولی (100 μm) DPPH اضافه شد. مخلوط در درجه حرارت اتاق قرار گرفته و پس از 15 دقیقه، جذب UV آن در طول موج 517 نانومتر در مقابل شاهد اتانول خوانده شد. آنتی‌اکسیدانت تجارتي BHT (هیدروکسی تولوئن بوتیل) به‌عنوان استاندارد در نظر گرفته شد. هر آزمایش سه بار تکرار شد.

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) و به‌دنبال آن با استفاده از آزمون چندگانه Tukey HSD صورت گرفت.

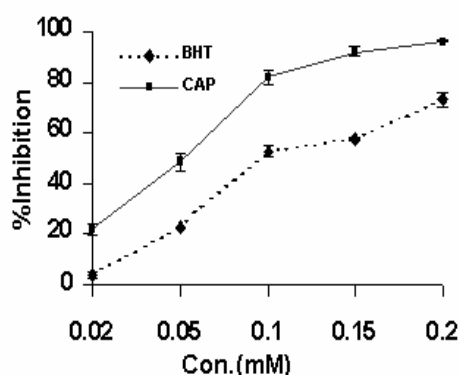
یافته‌ها

تاثیر کاپتوپریل روی میزان MnPCE القاء شده توسط اشعه گاما

نتایج حاصل از تاثیر کاپتوپریل روی کاهش درصد ریز هسته در سلول‌های مغز استخوان در جدول 1 آمده است. اشعه گاما به عنوان عامل سیتوژنتیک موجب افزایش درصد ریز هسته در سلول‌های پیش ساز خونی به میزان 9/65 درصد شده است و تفاوت فراوانی ریز هسته‌ها در گروه تابش دیده با گروه شاهدی که فقط حلال دریافت کردند از لحاظ آماری معنی دار می‌باشد (p<0.0001). گروه‌هایی از موش که کاپتوپریل را در مقادیر 10 و 25 و 50 میلی گرم بر کیلوگرم ،

فعالیت آنتی اکسیدانی

روش به دام اندازی رادیکال آزاد با DPPH برای بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات گیاهی و سنتتیک به فراوانی به کار می‌رود. نتایج آنتی اکسیدانی کاپتوپریل در نمودار 1 نشان داده شده است. کاپتوپریل با خاصیت آنتی اکسیدانی موجب کاهش میزان رادیکال آزاد DPPH شده است. این اثر آنتی اکسیدانی وابسته به غلظت می باشد و با افزایش غلظت، میزان درصد به دام اندازی رادیکال‌های آزاد افزایش یافته است. کاپتوپریل با غلظت 0/2mM موجب مهار 96 درصد رادیکال آزاد شده است. BHT به عنوان آنتی اکسیدان استاندارد در همان غلظت به کار رفته است. در تمام غلظت‌های مولی به کار رفته، کاپتوپریل اثر آنتی اکسیدانی بیش تری نسبت به BHT داشته است ($p < 0.01$).



نمودار شماره 1: خاصیت آنتی اکسیدانی کاپتوپریل (CAP) و هیدروکسی تولوئن بوتیل (BHT) در غلظت‌های 0/02 تا 0/2 میلی مول با روش DPPH و اسپکتروفتومتری در طول موج 517 نانومتر. هر آزمایش سه بار تکرار شده است.

یک ساعت قبل از تابش گاما به میزان 2 گری دریافت کردند، کاهش میزان ریز هسته در سلول‌های PCE به ترتیب 4/43، 4/10 و 6/20 می‌باشد ($p < 0.0001$). هر چند میزان کاهش ریز هسته با افزایش مقدار دارو از 25mg/kg کاپتوپریل کمتر از 10mg/kg بود ولی این اختلاف از لحاظ آماری معنی دار نبود. نسبت $PCE/(PCE+NCE)$ %

در گروه کنترل 61/6 درصد و در گروه پرتو دیده با 2 گری اشعه گاما 38/3 درصد می باشد و از لحاظ آماری این اختلاف معنی دار می باشد ($p < 0.0001$). تجویز کاپتوپریل در مقادیر 10 و 25 و 50 میلی گرم بر کیلوگرم موجب افزایش معنی دار این نسبت شده است؛ به طوری که با افزایش دز از 10 به 25mg/kg نسبت $PCE/(PCE+NCE)$ % به طور معنی داری افزایش یافته است ($p < 0.001$) و با افزایش مقدار به 50mg/kg این افزایش معنی دار نمی باشد. کاپتوپریل در مقدار 50mg/kg هیچ گونه اثر کلاستوزنیک و سمی نداشته است. کاپتوپریل در مقادیر 10 و 25 و 50 میلی گرم بر کیلوگرم موجب کاهش درصد ریز هسته با فاکتور 2/18 و 2/35 و 1/55 در مقایسه با گروهی که فقط اشعه دریافت کرده، می شود

جدول شماره 1: تاثیر کاپتوپریل روی ایجاد ریز هسته ناشی از اشعه در سلول‌های PCE و نسبت $PCE/(PCE+NCE)$ % در مغز استخوان موش‌های پرتو دیده با 2 گری اشعه گاما

گروه	نوع تیمار	MnPCE/PCE (%)	PCE/(PCE+NCE) (%)
1	شاهد	1/05 ± 0/13	61/63 ± 1/49
2	اشعه	9/65 ± 0/98	38/28 ± 1/09
3	اشعه + کاپتوپریل 10 mg/Kg	4/43 ± 0/26	44/18 ± 1/19
4	اشعه + کاپتوپریل 25 mg/Kg	4/10 ± 0/30	53/33 ± 2/08
5	اشعه + کاپتوپریل 50 mg/Kg	6/20 ± 0/46	53/63 ± 2/76
6	کاپتوپریل 50 mg/Kg	0/94 ± 0/07	62/0 ± 2/65

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که کاپتوپریل عوارض سیتوژنتیکی ناشی از اشعه را در سلول‌های مغز استخوان موش کاهش داده است. اثر محافظتی کاپتوپریل روی سمیت ژنتیکی ناشی از اشعه با تعیین میزان MnPCE در سلول‌های مغز استخوان، 24 ساعت پس از تجویز دارو ارزیابی شد. در این مطالعه، تجویز تک دز کاپتوپریل به صورت داخل صفاقی تشکیل ریز هسته ناشی از اشعه را کاهش داده است. کاپتوپریل با کاهش میزان MnPCE اثر ضد کلاستوژنتیکی بر روی عوارض جانبی اشعه داشته است. کاپتوپریل میزان نسبت $PCE/PCE+NCE$ % که توسط اشعه کاهش پیدا کرده بود را به طور قابل توجه افزایش داده است. پرتوهای یونساز رادیکال‌های آزاد تولید می‌کنند که منجر به آسیب به DNA و القاء عوارض ژنتیکی و مرگ در سلول می‌شود (8). به دام اندازی رادیکال‌های فعال یکی از مهم‌ترین روش‌های ضد جهش در ژن و ضد سرطان است (9). در مطالعه قبلی ما نشان دادیم که عصاره پوست نارنج با خاصیت آنتی‌اکسیدانی هنگامی که قبل از پرتو-دهی به موش تجویز شود مغز استخوان را به طور قابل توجهی محافظت می‌کند (5). در مطالعه حاضر کاپتوپریل خاصیت آنتی‌اکسیدانی خوبی داشته است. بنابر این اثر محافظتی کاپتوپریل در برابر اثر کلاستوژنتیکی ناشی از اشعه گاما می‌تواند به دلیل خاصیت به دام اندازی رادیکال‌های آزاد این دارو باشد. کاپتوپریل در ساختار مولکولی خودش دارای گروه SH است که نقش آنتی‌اکسیدانی دارد. تجویز کاپتوپریل به میزان 10 mg/kg به موش قبل از تابش 2 گری اشعه گاما میزان ریز هسته در سلول‌های PCE را 2/18 برابر کاهش داده است. در بین محافظ‌های پرتوی، آمیغوستین به عنوان محافظ پرتو قوی شناخته شده است اما این دارو برای اثر بخشی خود لازم است در مقادیر بالا تجویز

شود که این میزان تجویزی نزدیک به میزان سمی می‌باشد (2/3 دز LD₅₀) و موجب عوارض جانبی می‌شود (10). در این مطالعه نشان داده شد که کاپتوپریل به میزان 10mg/kg موش را محافظت می‌کند و این مقدار خیلی کوچکتر از LD₅₀ این دارو است (تجویز iv، میزان $LD_{50} > 1600$ mg/kg است) (11). در تحقیقات قبلی نشان داده شد که کاپتوپریل موکوس ژنوم و قلب موش را در برابر آسیب حاد ناشی از اشعه محافظت می‌کند. مکانیسم محافظتی کاپتوپریل در سمیت قلبی ناشی از اشعه مربوط به سیتوکین‌ها می‌باشد (4 و 12). کاپتوپریل فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد که به خاطر حضور گروه تیول در ساختار آن می‌باشد. این دارو هم‌چنین به دلیل قابلیت کمپلکس شدن با فلزات و افزایش دادن فعالیت آنزیم سوپر اکسید دسموتاز نقش آنتی‌اکسیدانی خود را اعمال می‌کند تجویز کاپتوپریل به حیوانات موجب افزایش میزان گلوکوتیون در بافت‌های مختلف شده است که افزایش گلوکوتیون همراه با افزایش میزان آنزیم سوپر اکسید دسموتاز موجب افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانی کاپتوپریل در شرایط استرس می‌شود (3، 13، 14).

کاپتوپریل به خاطر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و به دام اندازی رادیکال‌های آزاد ناشی از اشعه موجب کاهش اثرات تخریبی پرتوهای یونساز روی مولکول‌های حیاتی مانند DNA می‌شود و آسیب ژنتیکی ناشی از اشعه را روی مغز استخوان کاهش می‌دهد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از زحمات آقای دکتر زحمت‌کش که پرتودهی حیوانات را انجام دادند و همچنین از سرکار خانم محمدی فر در انستیتو پرتو پزشکی نوین که در انجام این طرح به ما یاری رساندند تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

فهرست منابع

2. Bump E, Malaker K. *Radioprotectors, Chemical, Biological and Clinical perspectives*. CRC press LLC, Boca Raton, Florida; 1997. P 15-18.
3. Lapenna D. The prooxidant properties of captopril. *Biochemical Pharmacology*; 1995; 50: 27-32.
4. Yoon SC. Radioprotective effect of captopril on the mouse jejunal mucosa. *Int. J. Radiat.oncol. Biol. Phys.* 1994; 30: 873-878.
5. Hosseinimehr SJ, Tavakoli H, Pourhediadri GR, Sobhai AG, Shafiee A. Radioprotective effects of citrus extract against gamma irradiation in mouse bone marrow cell. *J. Radiat. Res.* 2003; 44; 237-241.
6. Schmid W. The micronucleus test. *Mutation Res* 1975; 31: 9-15.
7. Koleva I, Van BEEK TA, Linssen J.P.H. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Anal.* 2002; 13: 8-17.
8. Reily PA. Free radicals in biology: oxidative stress and the effect of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol.* 1994; 65: 27-33
9. Tiwari AK. Imbalance in antioxidant defense and human diseases: multiple approach of natural antioxidants therapy. *Curr Sci.* 2001; 81: 1179-1187.
10. Mazur L. Radioprotective effects of the thiols GSH and WR-2721 against X-ray-induction of micronuclei in erythroblasts. *Mutation Res.* 2000; 468: 27-33.
11. Imai K, Hayashi Y, Hashimoto K. Acute toxicological studies of captopril in rats and mice. *J Toxicol Sci.* 1981; 6 Suppl 2: 179-88.
12. Chang SH, Lee KJ, Koo H. The Radioprotective Effect and Mechanism of Captopril on Radiation Induced-Heart Damage in Rats. *J Korean Soc Ther Radiol Oncol.* 2004; 22(1): 40-54.
13. Bartosz M, Kedziora J, Bartosz G. Antioxidant and prooxidant properties of captopril and enalapril. *Free Rad and Biol Med.* 1997; 23 : 729-735.
14. Jay D, Garcia EJ, Aviala MC, Munoz E. Superoxide-Superoxide oxidoreductase activity of the captopril-copper complex. *Arch. Medicine Res.* 2002; 33: 115-122.
1. کانکلین جمیر، جی، والکر ریچارد، آی، عواقب انفجارهای اتمی از دیدگاه پزشکی. م. دکتر حسین مزدارانی چاپ اول. دانشگاه امام حسین (ع) تهران، 1374.