Archive of SID

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره شانزدهم شماره 51 فروردین و اردیبهشت سال 1385 (23- 18)

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

سیدجلال حسینی مهر (Ph.D.)*+ عزیز محمود زاده (M.Sc.)** شهرام اخلاق پور (M.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 نهایتا عوارض سوء روی دستگاه‌های زیست- شناختی می شوند. ترکیباتی که خاصیت آنتی اکسیدانی داشته باشند با خنثی کردن اثرات رادیکال‌های آزاد موجب کاهش اثرات مخرب اشعه می شوند. در این مطالعه اثر محافظت پرتوی کاپتوپریل با آزمون میکرونوکلئوس برای ارزیابی اثرات ضد کلاستوژنیکس(Anticlastogenic) و تکثیر سلولی در مغز استخوان موش مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها : کاپتوپریل به‌صورت داخل صفاقی (ip) در مقادیر 10، 25 و50 میلی‌گرم یکساعت قبل از اشعه گاما (2گری) تزریق شد. حیوانات پس از 24 ساعت کشته و نمونه هایی 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 آنتی اکسیدانی 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 می باشد ($p<0.001$). مقدار مناسب کاپتوپریل برای محافظت در موش 10 mg/kg می باشد که مغز استخوان را به میزان 2/18 برابر در برابر اثر کلاستوژنیکس اشعه محافظت کرده است. در این مطالعه کاپتوپریل اثر آنتی اکسیدانی قابل توجهی داشت؛ به‌طوری‌که در غلظت 0/2mM بیش از 96% اثر مهار رادیکال آزاد داشته است.

استنتاج : نتایج این تحقیق نشان داد که کاپتوپریل احتمالا با مکانیسم آنتی اکسیدانی موجب حذف اثر تخریبی رادیکال‌های آزاد ناشی از پرتوهای یونساز روی سلول‌های مغز استخوان شده وآسیب ژنتیکی را کاهش می دهد.

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

مقدمه

پرتوهای یونیزان کاربرد فراوانی در علوم مختلف از جمله پزشکی‌دارند یکی از روش‌های به‌کارگیری اثرات پرتوها روی سلول‌ها، استفاده از رادیوتراپی در درمان تومورها است، اما اشعه علاوه بر ازبین 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- دانشکده‌داروسازی

www.SID.ir

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

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

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

علاوه برکاربرد محافظ پرتو ها درمقاصد پزشکی و درمانی، افرادجامعه می‌توانند به‌نوعی تحت تاثیرعوارض سوء ناشی از اشعه قرار گیرند. لذا با توجه به عوارض حاصل از پرتوها، 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 عمدتا 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(1و2). یکی ازاندام‌هایی که به اشعه خیلی حساس است، مغز استخوان می‌باشد. اشعه موجب کاهش فعالیت آن و کاهش سلول‌های پیش‌ساز خونی و همچنین آسیب ژنتیکی درمغزاستخوان می‌شود، به‌طوری‌که عوارض ناشی از اشعه روی مغز استخوان که عضوی حیاتی می باشددر 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 اثرمحافظتی روی ژئوژنوم 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 مغز استخوان با استفاده از آزمون معتبر میکرونوکلئوس مورد ارزیابی قرار گرفته است. میکرونوکله‌ای یا ریز هسته‌ها در واقع تکه های کروموزومی هستند که در طی فرایند میتوزی، به سلول حاصل از تقسیم منتقل نشده و در سیتوپلاسم سلول مادر باقی می مانند. میکرونوکله ای از سال 1975 تا کنون به‌عنوان آزمون معتبر برای بررسی آسیب‌های ژنتیکی ناشی از پرتوهای یونیزان عوامل شیمیایی به فراوانی مورد استفاده قرار می گیرد(5و 6).

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی:

پودر داروی کاپتوپریل با خلوص دارویی از شرکت داروپخش ایران تهیه شده است. دی فنیل پیکریل‌هیدرازیل‌ازشرکت ICN (آمریکا)، هیدروکسی تولوئن بوتیله، 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 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

کاپتوپریل را درنرمال 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، کبالت60 و مدل دستگاه Teratron 780 بود. فاصله منبع تابش تا سطح پوست 80cm وآهنگ مقدار پرتودهی (Dose Rate) 1/35 cGy/min بود. موش‌ها در گروهای 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 سرم‌جنین‌گاوی 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 لولهٔ 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، سپس‌با محلول رنگی مای‌گرانوالد 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 (نرموکروماتیک اریتروسیت) به رنگ زرد مشاهده شد.

بررسی خاصیت آنتی اکسیدانتی

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 درمقابل شاهد اتانول خوانده شد. آنتی‌اکسیدانت تجارتی BHT (هیدروکسی تولوئن بوتیله) 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 هسته ها 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 و25 و 50 میلی گرم بر کیلوگرم ،

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

www.SID.ir
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

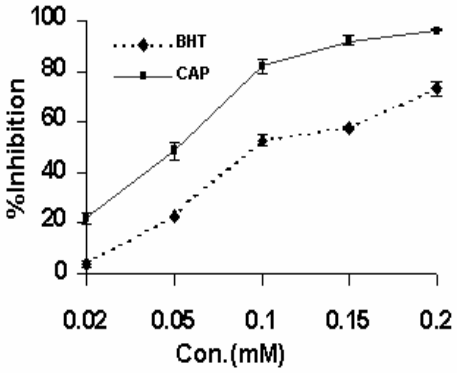
یک‌ساعت قبل ازتابش گاما به میزان 2 گری دریافت کردند، کاهش میزان ریز هسته در سلول‌های PCE به ترتیب
4/43، 4/10 و 6/20 می‌باشد($p<0.0001$). هرچند میزان کاهش ریز هسته با افزایش مقدار دارو از 10mg/kg به 25mg/kg کاپتوپریل کمتر از 10mg/kg بود ولی این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دارنبود. نسبت PCE/(PCE+NCE)% در گروه کنترل 61/6درصد و در گروه پرتو دیده با 2 گری اشعه گاما 38/3درصد می باشد و از لحاظ آماری این اختلاف معنی‌دار می باشد($p<0.0001$). تجویز کاپتوپریل در مقادیر 10 و 25 و 50 میلی‌گرم بر کیلوگرم موجب افزایش معنی‌دار این نسبت شده است؛ به‌طوری‌که با افزایش دز از 10 به 25mg/kg نسبت PCE/(PCE+NCE)% به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است($p<0.001$) وباافزایش‌مقداربه50mg/kgاین افزایش معنی‌دارنمی‌باشد.کاپتوپریل‌درمقدار50mg/kg هیچ‌گونه اثر کلاستوژنیک و سمی نداشته است. کاپتوپریل در مقادیر10 و25 و50 میلی‌گرم بر کیلوگرم موجب کاهش درصد ریز هسته با فاکتور 2/18 و 2/35 و 1/55 در مقایسه باگروهی که فقط اشعه دریافت‌کرده، می‌شود

جدول‌شماره1: 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

فعالیت آنتی اکسیدانی

روش به‌دام اندازی رادیکال آزاد با DPPH برای بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات گیاهی و سنتتیک به فراوانی به‌کار 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 به‌دام اندازی رادیکال‌های آزاد افزایش یافته است.. کاپتوپریل با غلظت 0/2mM موجب مهار 96درصد رادیکال آزاد شده است. BHT به‌عنوان آنتی اکسیدان استاندارد در همان غلظت به‌کار رفته است. در تمام غلظت‌های مولی به‌کار رفته، کاپتوپریل اثر آنتی اکسیدانی بیش‌تری نسبت به BHT داشته است ($p<0.01$).



نمودار شماره1: خاصیت آنتی‌اکسیدانی‌کاپتوپریل(CAP) وهیدروکسی تولوئن بوتیله (BHT) در غلظت‌های 0/02 تا 0/2میلی مول با روش DPPH و اسپکتروفتومتری در طول موج 517نانومتر. هر آزمایش سه بار تکرار شده است.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

www.SID.ir
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

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 درسلول‌های مغز استخوان، 24 ساعت پس از تجویز دارو ارزیابی شد. در این مطالعه، تجویز تک دز کاپتوپریل به‌صورت داخل صفاقی تشکیل ریز هسته ناشی از اشعه را کاهش داده است. کاپتوپریل با کاهش میزان MnPCE اثر ضد کلاستوژنیکی بر روی عوارض جانبی اشعه داشته است. کاپتوپریل میزان نسبت %PCE/PCE+NCE که توسط اشعه کاهش پیدا کرده بود را به‌طور قابل توجه افزایش داده است. پرتوهای یونساز رادیکال‌های آزاد تولید می کنند که منجر به آسیب به DNA و القاء عوارض ژنتیکی و مرگ در سلول می شود(8). به‌دام 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 آنتی اکسیدانی هنگامی‌که قبل از پرتو- دهی به موش تجویز شود مغز استخوان را به‌طور قابل توجهی محافظت می‌کند(5). در مطالعه حاضر کاپتوپریل خاصیت آنتی اکسیدانی خوبی داشته است. بنابر این اثر محافظتی کاپتوپریل در برابر اثر کلاستوژنیکی ناشی از اشعه گاما می‌تواند به‌دلیل خاصیت به‌دام اندازی رادیکال‌های آزاد این دارو باشد. کاپتوپریل در ساختار مولکولی خودش دارای گروه SH است که نقش آنتی اکسیدانی دارد. تجویز کاپتوپریل به میزان 10 mg/kg به موش قبل ازتابش 2 گری اشعه گاما میزان ریز هسته در سلول‌های PCE را 2/18 برابر کاهش داده است. دربین محافظ‌های‌پرتوی، آمیفوستین به‌عنوان 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 شدکه 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 ژژنوم و قلب موش را در برابر آسیب حاد ناشی از اشعه محافظت می‌کند.مکانیسم محافظتی‌کاپتوپریل درسمیت قلبی ناشی از اشعه مربوط به سیتوکین‌ها می‌باشد (4و12). کاپتوپریل فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد که به خاطر حضور گروه تیول در ساختار آن می‌باشد. این دارو هم‌چنین به‌دلیل قابلیت کمپلکس شدن با فلزات و افزایش دادن فعالیت آنزیم سوپر اکسید دسموتاز نقش آنتی اکسیدانی خود را اعمال می‌کند تجویز کاپتوپریل به حیوانات موجب افزایش میزان گلوتاتیون در بافت‌های مختلف شده است که افزایش گلوتاتیون همراه با افزایش میزان آنزیم سوپر اکسید دسموتاز موجب افزایش قدرت آنتی اکسیدانی کاپتوپریل در شرایط استرس می شود(3، 13،14).

کاپتوپریل به‌خاطر فعالیت آنتی اکسیدانی و به‌دام اندازی رادیکال‌های آزاد ناشی از اشعه موجب کاهش اثرات تخریبی پرتوهای یونساز روی مولکول‌های حیاتی مانند DNA می شود و آسیب ژنتیکی ناشی از اشعه را روی مغز استخوان کاهش می دهد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله 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.

www.SID.ir
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

فهرست منابع

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.
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 aginst 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره شانزدهم شماره 51 فروردین و اردیبهشت سال 1385 (23- 18)

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

سیدجلال حسینی مهر (Ph.D.)*+ عزیز محمود زاده (M.Sc.)** شهرام اخلاق پور (M.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 نهایتا عوارض سوء روی دستگاه‌های زیست- شناختی می شوند. ترکیباتی که خاصیت آنتی اکسیدانی داشته باشند با خنثی کردن اثرات رادیکال‌های آزاد موجب کاهش اثرات مخرب اشعه می شوند. در این مطالعه اثر محافظت پرتوی کاپتوپریل با آزمون میکرونوکلئوس برای ارزیابی اثرات ضد کلاستوژنیکس(Anticlastogenic) و تکثیر سلولی در مغز استخوان موش مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها : کاپتوپریل به‌صورت داخل صفاقی (ip) در مقادیر 10، 25 و50 میلی‌گرم یکساعت قبل از اشعه گاما (2گری) تزریق شد. حیوانات پس از 24 ساعت کشته و نمونه هایی 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 آنتی اکسیدانی 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 می باشد ($p<0.001$). مقدار مناسب کاپتوپریل برای محافظت در موش 10 mg/kg می باشد که مغز استخوان را به میزان 2/18 برابر در برابر اثر کلاستوژنیکس اشعه محافظت کرده است. در این مطالعه کاپتوپریل اثر آنتی اکسیدانی قابل توجهی داشت؛ به‌طوری‌که در غلظت 0/2mM بیش از 96% اثر مهار رادیکال آزاد داشته است.

استنتاج : نتایج این تحقیق نشان داد که کاپتوپریل احتمالا با مکانیسم آنتی اکسیدانی موجب حذف اثر تخریبی رادیکال‌های آزاد ناشی از پرتوهای یونساز روی سلول‌های مغز استخوان شده وآسیب ژنتیکی را کاهش می دهد.

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

مقدمه

پرتوهای یونیزان کاربرد فراوانی در علوم مختلف از جمله پزشکی‌دارند یکی از روش‌های به‌کارگیری اثرات پرتوها روی سلول‌ها، استفاده از رادیوتراپی در درمان تومورها است، اما اشعه علاوه بر ازبین 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- دانشکده‌داروسازی

www.SID.ir

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

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

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

علاوه برکاربرد محافظ پرتو ها درمقاصد پزشکی و درمانی، افرادجامعه می‌توانند به‌نوعی تحت تاثیرعوارض سوء ناشی از اشعه قرار گیرند. لذا با توجه به عوارض حاصل از پرتوها، 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 عمدتا 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(1و2). یکی ازاندام‌هایی که به اشعه خیلی حساس است، مغز استخوان می‌باشد. اشعه موجب کاهش فعالیت آن و کاهش سلول‌های پیش‌ساز خونی و همچنین آسیب ژنتیکی درمغزاستخوان می‌شود، به‌طوری‌که عوارض ناشی از اشعه روی مغز استخوان که عضوی حیاتی می باشددر 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 اثرمحافظتی روی ژئوژنوم 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 مغز استخوان با استفاده از آزمون معتبر میکرونوکلئوس مورد ارزیابی قرار گرفته است. میکرونوکله‌ای یا ریز هسته‌ها در واقع تکه های کروموزومی هستند که در طی فرایند میتوزی، به سلول حاصل از تقسیم منتقل نشده و در سیتوپلاسم سلول مادر باقی می مانند. میکرونوکله ای از سال 1975 تا کنون به‌عنوان آزمون معتبر برای بررسی آسیب‌های ژنتیکی ناشی از پرتوهای یونیزان عوامل شیمیایی به فراوانی مورد استفاده قرار می گیرد(5و 6).

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی:

پودر داروی کاپتوپریل با خلوص دارویی از شرکت داروپخش ایران تهیه شده است. دی فنیل پیکریل‌هیدرازیل‌ازشرکت ICN (آمریکا)، هیدروکسی تولوئن بوتیله، 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 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

کاپتوپریل را درنرمال 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، کبالت60 و مدل دستگاه Teratron 780 بود. فاصله منبع تابش تا سطح پوست 80cm وآهنگ مقدار پرتودهی (Dose Rate) 1/35 cGy/min بود. موش‌ها در گروهای 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 سرم‌جنین‌گاوی 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 لولهٔ 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، سپس‌با محلول رنگی مای‌گرانوالد 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 (نرموکروماتیک اریتروسیت) به رنگ زرد مشاهده شد.

بررسی خاصیت آنتی اکسیدانتی

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 درمقابل شاهد اتانول خوانده شد. آنتی‌اکسیدانت تجارتی BHT (هیدروکسی تولوئن بوتیله) 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 هسته ها 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 و25 و 50 میلی گرم بر کیلوگرم ،

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

www.SID.ir
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

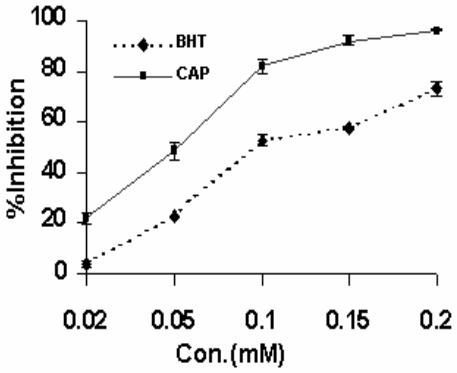
یک‌ساعت قبل ازتابش گاما به میزان 2 گری دریافت کردند، کاهش میزان ریز هسته در سلول‌های PCE به ترتیب
4/43، 4/10 و 6/20 می‌باشد($p<0.0001$). هرچند میزان کاهش ریز هسته با افزایش مقدار دارو از 10mg/kg به 25mg/kg کاپتوپریل کمتر از 10mg/kg بود ولی این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دارنبود. نسبت PCE/(PCE+NCE)% در گروه کنترل 61/6درصد و در گروه پرتو دیده با 2 گری اشعه گاما 38/3درصد می باشد و از لحاظ آماری این اختلاف معنی‌دار می باشد($p<0.0001$). تجویز کاپتوپریل در مقادیر 10 و 25 و 50 میلی‌گرم بر کیلوگرم موجب افزایش معنی‌دار این نسبت شده است؛ به‌طوری‌که با افزایش دز از 10 به 25mg/kg نسبت PCE/(PCE+NCE)% به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است($p<0.001$) وباافزایش‌مقداربه50mg/kgاین افزایش معنی‌دارنمی‌باشد.کاپتوپریل‌درمقدار50mg/kg هیچ‌گونه اثر کلاستوژنیک و سمی نداشته است. کاپتوپریل در مقادیر10 و25 و50 میلی‌گرم بر کیلوگرم موجب کاهش درصد ریز هسته با فاکتور 2/18 و 2/35 و 1/55 در مقایسه باگروهی که فقط اشعه دریافت‌کرده، می‌شود

جدول‌شماره1: 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

فعالیت آنتی اکسیدانی

روش به‌دام اندازی رادیکال آزاد با DPPH برای بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات گیاهی و سنتتیک به فراوانی به‌کار 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 به‌دام اندازی رادیکال‌های آزاد افزایش یافته است.. کاپتوپریل با غلظت 0/2mM موجب مهار 96درصد رادیکال آزاد شده است. BHT به‌عنوان آنتی اکسیدان استاندارد در همان غلظت به‌کار رفته است. در تمام غلظت‌های مولی به‌کار رفته، کاپتوپریل اثر آنتی اکسیدانی بیش‌تری نسبت به BHT داشته است ($p<0.01$).



نمودار شماره1: خاصیت آنتی‌اکسیدانی‌کاپتوپریل(CAP) وهیدروکسی تولوئن بوتیله (BHT) در غلظت‌های 0/02 تا 0/2میلی مول با روش DPPH و اسپکتروفتومتری در طول موج 517نانومتر. هر آزمایش سه بار تکرار شده است.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

www.SID.ir
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

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 درسلول‌های مغز استخوان، 24 ساعت پس از تجویز دارو ارزیابی شد. در این مطالعه، تجویز تک دز کاپتوپریل به‌صورت داخل صفاقی تشکیل ریز هسته ناشی از اشعه را کاهش داده است. کاپتوپریل با کاهش میزان MnPCE اثر ضد کلاستوژنیکی بر روی عوارض جانبی اشعه داشته است. کاپتوپریل میزان نسبت %PCE/PCE+NCE که توسط اشعه کاهش پیدا کرده بود را به‌طور قابل توجه افزایش داده است. پرتوهای یونساز رادیکال‌های آزاد تولید می کنند که منجر به آسیب به DNA و القاء عوارض ژنتیکی و مرگ در سلول می شود(8). به‌دام 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 آنتی اکسیدانی هنگامی‌که قبل از پرتو- دهی به موش تجویز شود مغز استخوان را به‌طور قابل توجهی محافظت می‌کند(5). در مطالعه حاضر کاپتوپریل خاصیت آنتی اکسیدانی خوبی داشته است. بنابر این اثر محافظتی کاپتوپریل در برابر اثر کلاستوژنیکی ناشی از اشعه گاما می‌تواند به‌دلیل خاصیت به‌دام اندازی رادیکال‌های آزاد این دارو باشد. کاپتوپریل در ساختار مولکولی خودش دارای گروه SH است که نقش آنتی اکسیدانی دارد. تجویز کاپتوپریل به میزان 10 mg/kg به موش قبل ازتابش 2 گری اشعه گاما میزان ریز هسته در سلول‌های PCE را 2/18 برابر کاهش داده است. دربین محافظ‌های‌پرتوی، آمیفوستین به‌عنوان 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 شدکه 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 ژژنوم و قلب موش را در برابر آسیب حاد ناشی از اشعه محافظت می‌کند.مکانیسم محافظتی‌کاپتوپریل درسمیت قلبی ناشی از اشعه مربوط به سیتوکین‌ها می‌باشد (4و12). کاپتوپریل فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد که به خاطر حضور گروه تیول در ساختار آن می‌باشد. این دارو هم‌چنین به‌دلیل قابلیت کمپلکس شدن با فلزات و افزایش دادن فعالیت آنزیم سوپر اکسید دسموتاز نقش آنتی اکسیدانی خود را اعمال می‌کند تجویز کاپتوپریل به حیوانات موجب افزایش میزان گلوتاتیون در بافت‌های مختلف شده است که افزایش گلوتاتیون همراه با افزایش میزان آنزیم سوپر اکسید دسموتاز موجب افزایش قدرت آنتی اکسیدانی کاپتوپریل در شرایط استرس می شود(3، 13،14).

کاپتوپریل به‌خاطر فعالیت آنتی اکسیدانی و به‌دام اندازی رادیکال‌های آزاد ناشی از اشعه موجب کاهش اثرات تخریبی پرتوهای یونساز روی مولکول‌های حیاتی مانند DNA می شود و آسیب ژنتیکی ناشی از اشعه را روی مغز استخوان کاهش می دهد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله 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.

www.SID.ir
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

فهرست منابع

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.
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 aginst 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com