

بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی کاپتوپریل بر روی سمیت ناشی از پاراکوات در میتوکندری‌های جدا شده کبد موش صحرائی

افشین محمدی بردبری^۱ و دکتر محمود قاضی خوانساری^{۲*}

خلاصه

مقدمه: هدف از این مطالعه نشان دادن توانایی کاپتوپریل به عنوان یک داروی تیول‌دار مهارکننده آنزیم مبدل آنژیوتانسین در جلوگیری از سمیت ناشی از پاراکوات در میتوکندری‌های جدا شده از کبد رت می‌باشد. روش: در این مطالعه ابتدا میتوکندری‌های کبد موش صحرائی به وسیله سانتریفیوژ یخچال‌دار جدا گردیدند. غلظت‌های مختلف پاراکوات (۰/۱mM تا ۱۰۰mM) و کاپتوپریل (۰/۰۸mM تا ۱mM) برای به دست آوردن دوز مناسب پاراکوات و دوز مؤثر کاپتوپریل (sub maximal) به وسیله تعیین متغیرهای درصد بقاء، LC_{50} ، شاخص پراکسیداسیون لیپیدی (TBARS)، فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT activity)، میزان گلوکوتایون اکسید و احیاء (GSH,) و GSSG و تورم میتوکندریایی (Mitochondrial swelling) مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: میزان LC_{50} ($5/761 \pm 2/386$) با روش MTT assay به دست آمد. در بررسی دوز-پاسخ غلظت‌های مختلف پاراکوات اختلاف معنی‌داری در غلظت‌های بالای ۱mM با همدیگر و گروه کنترل مشاهده گردید. در بررسی دوز-پاسخ غلظت‌های مختلف کاپتوپریل کاهش معنی‌داری در دوز ۰/۱mM و بالاتر با گروه کنترل مشاهده گردید. در بررسی هم‌زمان تیمار پاراکوات (۵mM) با کاپتوپریل (۰/۰۸mM) کاهش معنی‌داری در سمیت ناشی از پاراکوات در بررسی شاخص‌های ذکر شده بالا مشاهده گردید ($P < 0/001$).

نتیجه‌گیری: نتایج این آزمایشات نشان می‌دهد که کاپتوپریل به دلیل دارا بودن گروه تیول می‌تواند به عنوان یک آنتی‌اکسیدان آگروژنوس در کاهش سمیت میتوکندریایی ناشی از پاراکوات و دیگر مواد تولیدکننده رادیکال‌های آزاد مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: پاراکوات، میتوکندری‌های جدا شده کبد موش صحرائی، کاپتوپریل، استرس اکسیداتیو

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد سم‌شناسی، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران و دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی

شیراز ۲- دانشیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران

* نویسنده مسؤول: گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران • آدرس پست الکترونیک: ghazikha@sina.tums.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۳/۲۴ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۵/۷/۸ پذیرش مقاله: ۱۳۸۵/۷/۲۶

مقدمه

روی می‌دهد. البته مطالعات نشان داده است که کاپتوپریل باعث بهبود فیبروز و استرس-اکسیداتیو در محیط *in vitro* شده است. درمان با انالاپریل یا کاپتوپریل موجب افزایش سطح آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی و غیر آنزیمی در بافت‌های مختلف موش سوری شده است (۱۲). اثر آنتی‌اکسیدانتی کاپتوپریل به صورت آنزیماتیک و غیر آنزیماتیک در بافت‌های مختلف موش نشان داده شده است و بعضی از مطالعات *in vitro* نیز دال بر تأثیر گروه‌های سولفیدریل کاپتوپریل بر روی کاهش رادیکال‌های آزاد می‌باشد (۳۰).

در این مطالعه اثر آنتی‌اکسیدانتی کاپتوپریل بر روی سمیت ناشی از پاراکوات در میتوکندری‌های جدا شده از کبد موش صحرایی مورد ارزیابی قرار گرفته است.

روش بررسی

الف) مواد

در این تحقیق پاراکوات دی‌کلراید و کاپتوپریل و سایر مواد از کمپانی سیگما، مورد استفاده قرار گرفتند.

ب) روش‌ها

۱- جداسازی میتوکندری:

ابتدا موش صحرایی به وسیله کتامین (۵۰ mg/kg) و کلروپرومازین (۳۰ mg/kg) بیهوش گردید. کبد موش صحرایی از بدن حیوان جدا و با قیچی تکه تکه شد. سپس در محلول مانتیول ۰/۲۲۵M٪ و ساکاروز ۷۵mM و EDTA ۰/۲mM شستشو داده شد. کبد تکه تکه شده (۳۰ گرم) به آرامی در هموژنایزر با دسته تفلونی همراه با محلول محتوی بافر تریس- HCl (۰/۰۵M, pH=۷/۴)، ساکارز ۰/۲۵M KCl، ۲۰mM MgCl₂، ۱۰mM Na₂HPO₄ هموژنیزه گردید و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰g در دمای ۴ C به وسیله سانتریفوژ یخچال دار سانتریفوژ شد. در این مرحله هسته و سلول‌های شکسته شده و دیگر بافت‌های سلولی حذف می‌شوند. سپس سوپرناتانت به دست آمده در ۷۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سوپرناتانت دومی حاوی قطعات میکروزومال و میتوکندری‌های شکسته شده است. قسمت پایینی، دوباره در محلول فوق‌الذکر به حالت معلق درآمده و در ۷۰۰۰g برای ۲۰ دقیقه دوباره سانتریفوژ گردید. برای خالص‌سازی این مرحله چند بار تکرار شد. میتوکندری‌های جدا شده در محلول بافری بالا در دمای ۴ C برای سنجش‌های مورد نظر به حالت معلق در آورده شد (۳۳).

۲- طراحی آزمایشات:

مطالعات نشان می‌دهند استرس اکسیداتیو نقش مهمی در پاتوژنز بیماری‌های مختلفی از قبیل سرطان، دیابت، بیماری‌های قلبی عروقی، پارکینسون، شیزوفرنی، آترواسکلروزیس، بیماری‌های ریوی و کاتاراکت دارد (۳۴). استرس اکسیداتیو ناشی از ایجاد رادیکال‌های آزاد است و میتوکندری‌ها محل اصلی تولید رادیکال‌های آزاد شناخته می‌شوند (۷). به نظر می‌رسد ترکیبات ناقل الکترون [مانند فلاووپروتئین‌ها و یوبی‌سمی‌کینون (ubisemiquinone)] در این امر دخیل باشند (۷، ۳۸) و مهار زنجیره انتقال الکترون باعث افزایش سطح اکسیداسیون خود به خودی این ترکیبات و ایجاد رادیکال‌های آزاد می‌شود (۳، ۱۹). میتوکندری‌ها اهداف انتخابی برای سمیت پاراکوات در بافت‌های حیوانی و گیاهی هستند (۳۶).

N و N' پاراکوات - دی متیل ۴ و ۴ دی‌پیریدین عمدتاً به عنوان علف‌کش به کار می‌رود و در پستانداران سبب صدمات شدید ریوی و صدمات دیگر می‌گردد. این علف‌کش‌ها برای انسان و حیوانات (به ویژه با مکانیسم سمیت تأخیری برای انسان) بسیار سمی هستند و این سمیت در ارتباط با سیستم اکسیداسیون و احیاء میتوکندریال و میکروزومال است (۲۴). مکانیسم سمیت پاراکوات اغلب در ارتباط با تولید آنیون سوپراکسید است که می‌تواند به تولید مقادیر زیاد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) از قبیل پراکسید هیدروژن و آنیون سوپراکسید منجر گردد که این دو رادیکال آزاد به عنوان دو توکسیکانت عمده به شمار می‌روند (۱۳، ۲۴، ۳۶). این رادیکال‌های آزاد همچنین باعث پراکسیداسیون لیپیدی، اختلال در غشاء میتوکندری و آسیب به DNA و پروتئین، کاهش ذخایر آنتی‌اکسیدانی سلول و میتوکندری از قبیل گلوکاتایون احیاء، افزایش گلوکاتایون اکسید، کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز، باعث تورم میتوکندریایی و کاهش سنتز ATP می‌گردند (۳۴). پاراکوات همچنان با تأثیر بر سیستم جداسازی اکسیداسیون از فسفوریلاسیون در کمپلکس زنجیره تنفسی از طریق مهار کمپلکس III, IV میتوکندریایی سبب دپرسیون زنجیره تنفسی می‌گردد (۳۲).

داروهای مهار آنزیم مبدل آنژیوتانسین (ACEi) که دارای اعمال محافظت قلبی و ضد فشارخون است، به طور معمول برای درمان افزایش فشارخون و دیگر بیماری‌های قلبی-عروقی بکار می‌روند (۵، ۲۲، ۲۳). اثرات سودمند مهار آنزیم مبدل آنژیوتانسین به طور عمده از طریق مهار تشکیل آنژیوتانسین II

تکان داده شد و سپس در ۳۵۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. لایه n- بوتانل برای سنجش در طول موج nm ۵۳۲ جدا شده و مقدار TBARS از رابطه زیر محاسبه گردید (۲):

$$E_{532} = 165 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

۶- اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT activity): روش اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز به وسیله Cyman Kit بر اساس واکنش آنزیم با متانول در حضور غلظت کافی H_2O_2 است که فرم الئید تولید شده در حضور یک کروماژن (Purpald) در nm ۵۴۰ سنجیده می شود.

سنجش گلوکوتاتیون

۷- بعد از تیمار گروه های مختلف میتوکندریایی با پاراکوات و کاپتوپریل به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد سوپرناتانت به وسیله سانتریفوژ با دور ۱۰۰۰۰ rpm جدا و حذف گردید و میتوکندری ها با بافر چند بار شستشو داده شدند. سپس به هر کدام از تیوب ها ۰/۲ میلی لیتر از محلول TCA ۲۰٪ اضافه شد و بعد از حذف رسوب حاصله محلول روئی برای سنجش به دو قسمت تقسیم گردید.

۷-۱) سنجش گلوکوتاتیون احیاء (GSH)

به ۱ ml از محلول فوق ۲ میلی لیتر Na_2HPO_4 ۰/۳ مولار و ۰/۵ میلی لیتر DTNB اضافه شد و جذب فوراً در ۴۱۲ nm قرائت شد و مقدار GSH از منحنی کالیبراسیون به دست آمد.

۷-۲) سنجش گلوکوتاتیون تام GSH+GSSG

به ۱ ml از محلول فوق الذکر ۱ ml از محلول NaBH_4 ۵٪ اضافه شد و تیوب ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند و بعد از اتمام واکنش به هر تیوب ۰/۵ میلی لیتر NH_4YHCl اضافه گردید و GSSG احیاء شده + GSH به روش بالا اندازه گیری شد. (در این سنجش pH محیط باید به دقت تنظیم گردد) (۳۷، ۳۵).

۸- سنجش تورم میتوکندریایی (Mitochondrial swelling): به

۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون میتوکندریایی ۰/۲ میلی لیتر از محلول ۰/۳۴ مولار سوکروز- تریس اضافه شد و جذب در nm ۵۲۰ به مدت ۱ ساعت هر ۵ دقیقه یک بار قرائت گردید. بعد از یک ساعت برای معکوس کردن فاز از محلول ATP ۰/۰۵M و MgCl_2 ۰/۰۳M و EDTA ۰/۰۱M استفاده شد (۲۱).

۹- محاسبه درصد بقاء: درصد سمیت میتوکندریایی و درصد بقاء یا فعالیت میتوکندریایی برای هر نمونه به روش زیر مورد محاسبه قرار گرفت (۱۶).

۱-۲ دوز - پاسخ پاراکوات و کاپتوپریل: سوسپانسیون میتوکندریایی به ۸ گروه تقسیم گردید: گروه ۱ شامل گروه کنترل، گروه های ۲، ۳، ۴، ۵، به ترتیب شامل غلظت های مختلف پاراکوات (۱، ۵، ۱۰ و ۱۰۰ mM) و گروه های ۶، ۷، ۸ شامل غلظت های مختلف کاپتوپریل (۰/۰۸، ۰/۱، ۱ mM) بود.

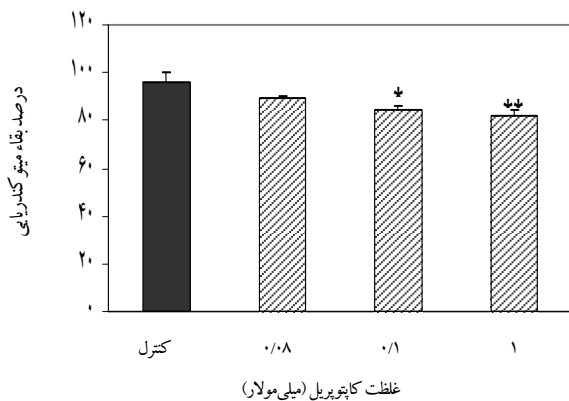
۲-۲ اثر هم زمان کاپتوپریل و پاراکوات: سوسپانسیون میتوکندریایی به ۴ گروه تقسیم گردید: گروه ۱ گروه کنترل، گروه ۲ گروه پاراکوات ۵ mM، گروه ۳ شامل کاپتوپریل ۰/۰۸ mM و گروه ۴ شامل پاراکوات ۵ mM + کاپتوپریل ۰/۰۸ mM بود. هر کدام از گروه ها حداقل ۶ عدد و هر آزمایش ۲ بار تکرار گردید.

۳- سنجش Viability و میزان LC_{50} به وسیله روش MTT assay:

سنجش درصد بقاء سلولی یا فعالیت میتوکندریایی با MTT که برای میتوکندری های ایزوله اصلاح شده است (۱۷). این روش رنگ سنجی، معیاری کمی برای تعیین Viability است که در آن نمک زرد رنگ تترازولیم (MTT) به وسیله آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی به فورمازون بنفش رنگ تبدیل می شود. ابتدا سوسپانسیون میتوکندریایی با غلظت های مختلف پاراکوات و کاپتوپریل مخلوط گردید و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. سوپرناتانت به وسیله سانتریفوژ با دور ۱۰۰۰۰ rpm جدا و حذف شد. سپس محلول MTT در بافر به تیوب ها اضافه شد تا غلظت نهایی به ۰/۲ mg/ml رسید و سپس تیوب ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. به هر کدام از تیوب ها ۲۰۰ μl DMSO اضافه شد و با Shaker خوب تکان داده شد. ۱ ساعت بعد جذب در طول موج nm ۵۶۰ و طول موج رفرانس nm ۶۳۰ با کالیبراسیون ۱/۹۹ به وسیله Multi plate reader قرائت گردید. (در صورت پر رنگ بودن نمونه ها از کالیبراسیون ۱ استفاده می شود).

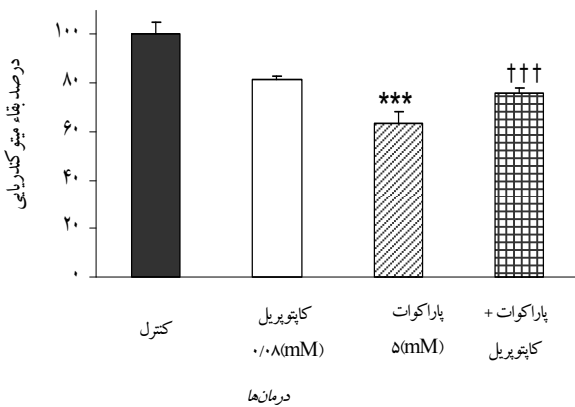
۴- اندازه گیری غلظت پروتئین و نرمالیز کردن داده ها: به روش Bio-red غلظت پروتئین هر نمونه اندازه گیری شد (۱۷) و برای هر کدام از فاکتورهای که مورد اندازه گیری قرار گرفت میزان آن فعالیت با غلظت پروتئین نرمالیز گردید.

۵- اندازه گیری TBARS: پراکسیداسیون لیپیدی بر اساس روش تیوباریتوریک اسید اندازه گیری شد. بدین ترتیب که به ۱ ml از سوسپانسیون میتوکندریایی ۲ ml از معرف TBA شامل ۰/۵HCl، ۱۵TCA و ۰/۳٪ اضافه شد و به خوبی مخلوط و در حمام آب گرم به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید و بعد از سرد شدن به آن ۲ ml n- بوتانل اضافه گردید و خوب



شکل ۲: برای به دست آوردن دوز (Sub maximal) کاپتوپریل به وسیله سوسپانسیون میتوکندریایی به مدت ۱ ساعت با غلظت‌های مختلف کاپتوپریل تیمار گردید.

گروه‌های تیمار شده با کاپتوپریل در غلظت‌های بالاتر از ۰/۱ mM تفاوت معنی‌داری با همدیگر و گروه کنترل نشان دادند. ($P < ۰/۰۵$)* ($P < ۰/۰۱$)**



شکل ۳: تأثیر کاپتوپریل بر روی درصد بقاء میتوکندریایی القاء شده به وسیله پاراکتول بعد از ۱ ساعت تیمار به وسیله پاراکتول و کاپتوپریل.

تمام داده‌ها (۶ نمونه) به صورت Mean±SEM بیان شده‌اند و هر آزمایش ۲ دویار تکرار گردید. ††† تفاوت معنی‌داری با گروه پاراکتول به تنهایی ($P < ۰/۰۰۱$). xxx تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل ($P < ۰/۰۰۱$)

۴- محاسبه GSH و GSSG: سطح GSH و GSSG در گروه‌های فوق‌الذکر مورد بررسی قرار گرفت که سطح GSH گروه تیمار شده با پاراکتول (5mM) به تنهایی کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد و پاراکتول (5mM)+کاپتوپریل (0/08mM) نشان داد در تمام گروه‌های مورد مطالعه هر کاهش قابل مشاهده در سطح GSH با یک افزایش معنی‌دار در سطح GSSG همراه بود. $P < ۰/۰۰۱$ (جدول ۱).

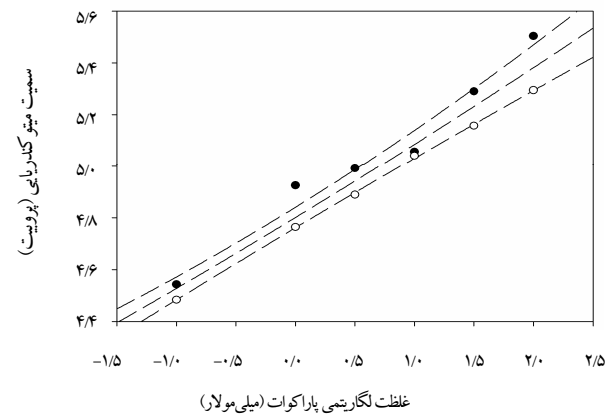
۵- فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT activity): داده‌ها تفاوت

$$\text{درصد سمیت میتوکندریایی} = \frac{\text{متوسط جذب ماده سمی}}{\text{متوسط جذب گروه کنترل منفی}} \times 100$$

درصد سمیت میتوکندریایی = ۱۰۰ = درصد فعالیت میتوکندریایی
 ۱۰- آنالیز داده‌ها: تمام داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار (SEM) از ۶ نمونه انجام شد و برای آنالیز آماری از ANOVA به همراه آزمون Student - Newman Keules استفاده گردید. محاسبه LC_{50} به وسیله نرم افزار Instat انجام گرفت تا برآورد قابل تشخیصی از نتایج به دست آید همه محاسبات به وسیله کامپیوتر با بکارگیری نرم‌افزار SPSS انجام گرفت.

نتایج

۱- سنجش درصد بقاء و دوز-پاسخ پاراکتول: گروه‌های تیمار شده با پاراکتول در غلظت‌های بالاتر از ۱mM تفاوت معنی‌داری با همدیگر و گروه کنترل نشان دادند. LC_{50} سم پاراکتول به وسیله MTT ($۵/۷۶۱ \pm ۲/۳۸۶$) محاسبه شد (شکل ۱).



شکل ۱: محاسبه LC_{50} سم پاراکتول بعد از ۱ ساعت تیمار

میتوکندری‌های جدا شده از کبد موش صحرایی با پاراکتول

تمام داده‌ها (۶ نمونه) به صورت Mean±SEM بیان شده‌اند و هر آزمایش ۲ دویار تکرار گردید.

۲- به دست آوردن دوز مناسب کاپتوپریل: سوسپانسیون میتوکندریایی با غلظت‌های مختلف کاپتوپریل تیمار گردید که تفاوت معنی‌داری در دوز ۰/۱mM و بالاتر با گروه کنترل مشاهده گردید (شکل ۲).

۳- تیمار هم‌زمان کاپتوپریل و پاراکتول: تیمار هم‌زمان پاراکتول (5mM) با کاپتوپریل (0/08mM) بهبود معنی‌داری ($P < ۰/۰۰۱$) در کاهش سمیت ناشی از پاراکتول نسبت به گروه پاراکتول (5mM) به تنهایی نشان داد (شکل ۳).

۶- پراکسیداسیون لیپیدی (TBARS): غلظت TBARS افزایش معنی داری ($P < 0/001$) در گروه تیمار شده با پاراکوات (5mM) نسبت به گروه کنترل و گروه تیمار شده با پاراکوات (5mM) + کاپتوپریل ($0/08\text{mM}$) نشان داد (جدول ۱).

معنی دار قابل مشاهده ای ($P < 0/001$) در سطح فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه تیمار شده با پاراکوات نسبت به گروه کنترل و گروه تیمار شده با پاراکوات (5mM) + کاپتوپریل ($0/08\text{mM}$) نشان می دهند (جدول ۱).

جدول ۱: تأثیر کاپتوپریل بر روی معیارهای بیوشیمیایی میتوکندریایی القاء شده به وسیله پاراکوات بعد از ۱ ساعت تیمار به وسیله پاراکوات و کاپتوپریل

گروهها	کنترل	کاپتوپریل $0/08$ میلی مولار	پاراکوات 5 میلی مولار	کاپتوپریل $0/08$ میلی مولار + پاراکوات 5 میلی مولار
GSH (nmol/mg protein)	$12/99 \pm 0/16$	$14/81 \pm 0/33$	$11/42 \pm 0/17^*$	$13/48 \pm 0/22^+$
GSSG (nmol/mg protein)	$0/45 \pm 0/16$	$0/38 \pm 0/33$	$2/036 \pm 0/17^*$	$0/44 \pm 0/22^+$
Catalase activity (nmol/mg protein/min)	$56/02 \pm 0/65$	$56/00 \pm 1/77$	$23/00 \pm 0/67^*$	$38/17 \pm 0/07^+$
TBARs (nmol/mg protein)	$2/99 \pm 0/001$	$3/01 \pm 0/001$	$3/23 \pm 0/002^*$	$3/05 \pm 0/001^+$

تمام دادهها (نمونه ۶) به صورت Mean \pm SEM بیان شده اند و هر آزمایش ۲ دویار تکرار گردید.

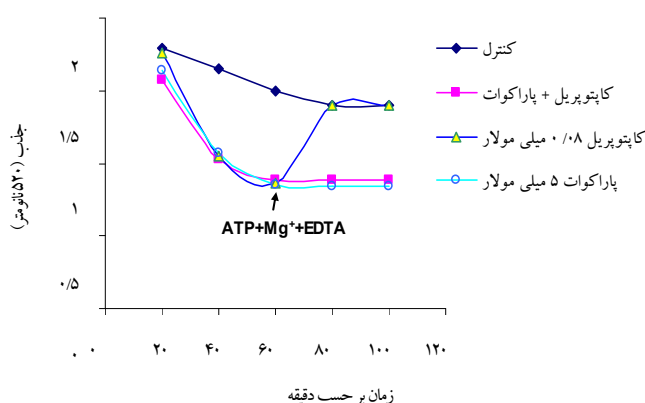
† تفاوت معنی دار با گروه پاراکوات به تنهایی ($P < 0/001$). × تفاوت معنی دار با گروه کنترل ($P < 0/001$).

بحث و نتیجه گیری

امروزه نقش میتوکندری در سن شروع بیماری، شدت بیماریها، اپوپتوزیس و مرگ سلولی مشخص شده است (۳۴). اهمیت مطالعه میتوکندریها به علت نقش این ارگانل در پاتولوژی بسیاری از بیماریها و پیری است (۲۶). گروهی سمیت پاراکوات را نقش سیستم میکروزمال خارج میتوکندریایی می دانند (۲۴). در مقابل عده ای عقیده دارند میتوکندری محل اصلی سمیت پاراکوات است (۳۹) که تورم میتوکندریایی این ارگانل این نظریه را تأیید می کند (۸،۱۷).

رادیکالهای آزاد و گونه های فعال اکسیژن از راه های مختلفی از قبیل سیستم انتقال الکترون میتوکندریایی، سیستم گزانتین اکسیداز، سیستم ایمنی و از منابع خارجی از قبیل مصرف الکل، سیگار کشیدن، اشعه، حلالها، بعضی از آنتی بیوتیکها و داروهای ضد سرطان تولید می شوند. نقص در زنجیره انتقال الکترون مسؤل ایجاد رادیکال آزاد اضافی است و این افزایش در تولید گونه های فعال (ROS) از قبیل H_2O_2 و OH و O_2 به صورت طبیعی با انتقال الکترون از زنجیره انتقال الکترون اتفاق می افتد (۳۴) به همین علت تعدادی مکانیسم های دفاعی در سلول از قبیل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون پراکسیداز و ردوکتاز در موجودات هوازی

۷- تورم میتوکندریایی (Mitochondrial swelling): تمام گروهها قبل از اضافه کردن $\text{ATP} + \text{Mg}^{2+} + \text{EDTA}$ کاهش قابل ملاحظه ای در کاهش جذب از خود نشان دادند. بعد از ۱ ساعت به تمام گروهها $\text{ATP} + \text{Mg}^{2+} + \text{EDTA}$ اضافه شد فقط گروه کنترل و کاپتوپریل ($0/08\text{mM}$) تفاوت معنی داری در افزایش جذب از خود نشان دادند. هر چند گروه کاپتوپریل ($0/08\text{mM}$) + پاراکوات (5mM) نسبت به گروه پاراکوات به تنهایی اندکی افزایش جذب از خود نشان داد اما این افزایش معنی دار نبود (شکل ۴).



شکل ۴: تأثیر کاپتوپریل بر روی تورم میتوکندریایی القاء شده به وسیله پاراکوات.

بعد از ۱ ساعت برای معکوس کردن فاز از $\text{ATP} + \text{Mg}^{2+} + \text{EDTA}$ استفاده شد.

تمام دادهها (نمونه ۶) به صورت Mean \pm SEM بیان شده اند و هر آزمایش ۲ دویار تکرار گردید.

میتوکندری جلوگیری می کند (۲۵). در این تحقیق میزان تورم میتوکندریایی مورد بررسی قرار گرفت که تمام گروه‌ها به جز کنترل کاهش جذب از خود نشان دادند. بعد از ۱ ساعت به تمام گروه‌ها ATP اضافه گردید که تنها گروه کاپتوپریل افزایش جذب از خود نشان داد هر چند گروه تیمار شده همزمان پاراکوات و کاپتوپریل اندکی افزایش جذب نسبت به گروه پاراکوات به تنهایی نشان دادند اما این افزایش جذب معنی‌دار نبود (شکل ۳). کاهش GSH تام منعکس کننده وجود ROS است که همراه با افزایش GSSG است بنابراین کاهش GSH و افزایش GSSG که در جدول ۱ نشان داده شده مارکری برای سنجش اکسیداتیو استرس است (۲۱).

هر چند در مطالعات محققان در مورد توانایی ACEi برای از بین بردن ROS اتفاق نظر وجود ندارد بعضی از مطالعات *in vitro* دال بر اثر بخشی ترکیبات غیر سولفیدریل مانند لیزونپریل و انالپریل و هم چنین ترکیب تیول‌دار کاپتوپریل است (۳۰). در مقابل عده‌ای عقیده دارند فقط ترکیبات سولفیدریل دار از قبیل کاپتوپریل دارای عمل آنتی اکسیداتی هستند و به نظر می‌رسد از نقطه نظر مولکولی این نظریه صحیح‌تر باشد. در مطالعات اخیر نقش آنتی اکسیدانت‌ها از قبیل ویتامین E در استرس اکسیداتیو مشخص شده است (۱۵). هر چند کاپتوپریل در محیط *in vitro* یک آنتی اکسیدان خوب محسوب می‌شود اما در شرایط *in vivo* به علت حذف در گردش یا نرسیدن به غلظت مطلوب آنتی اکسیدانی قادر به ایفای نقش نمی‌باشد. در این رابطه بعضی از مطالعات نشان داد استفاده از فرمولاسیون لیپوزومی آنتی اکسیدان‌ها می‌تواند از اکسید شدن GSH به GSSG جلوگیری نماید (۳۵) و این امر در مطالعات آینده می‌تواند امیدوار کننده باشد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه در قالب طرح تحقیقاتی شماره ۱۳۲/۱۳۷ مورخه ۱۳۸۵/۱۲/۲۷ دانشگاه علوم پزشکی تهران مورد حمایت قرار گرفته است. بدین وسیله از کلیه کسانی که در این امر ما را یاری دادند صمیمانه سپاسگزاریم.

توسعه یافته است. ROS باعث القاء اپوپتوزیس (۲،۲۵،۳۵) و پراکسیداسیون لیپیدی و واکنش با پروتئین DNA و لیپید می‌شود (۳۴). پراکسیداسیون لیپیدی باعث افزایش اثرات زیان‌آور از قبیل افزایش سختی غشاء، شکنندگی اسموتیک، کاهش مواد درون سلولی، کاهش بقاء میتوکندریایی و سیالیت غشاء می‌گردد (۱). همچنین غشاء نسبت به نفوذ H_2O_2 بسیار نفوذپذیر می‌گردد (۱۰). سمیت پاراکوات با تولید H_2O_2 همراه است (۱۳،۲۰). در مطالعات اخیر نقش آنتی اکسیدانت‌ها از قبیل ویتامین E در استرس اکسیداتیو مشخص شده است (۱۵). دفاع سلولی در برابر رادیکال‌های آزاد به صورت آنزیماتیک و غیر آنزیماتیک صورت می‌گیرد که از میان روش‌های آنزیماتیک می‌توان به سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز اشاره کرد. سوپر اکسید دیسموتاز رادیکال سوپر اکسید (O_2^-) را به آب اکسیژنه (H_2O_2) تبدیل می‌کند و آنزیم کاتالاز آب اکسیژنه را به اکسیژن ملکولی و آب می‌شکند (۱۸). در این تحقیق نشان داده شد که کاپتوپریل به عنوان یک ترکیب تیول‌دار می‌تواند روند کاهش آنزیم کاتالاز ناشی از پاراکوات را به دلیل ایجاد رادیکال‌های آزاد بهبود ببخشد (جدول ۱). تورم میتوکندری‌ها به وسیله تعدادی از مواد به صورت خود به خود شروع شده و به وسیله ATP اگزوزن به صورت معکوس در می‌آید. (۲۵). پاراکوات باعث تورم میتوکندریایی می‌شود (۸،۱۱،۱۷،۲۸) که این مطالعات داده‌های مطالعه حاضر را تأیید می‌کنند. همان‌طور که در شکل ۳ دیده می‌شود این تغییرات می‌تواند در عملکرد سلول اختلال ایجاد کرده و باعث مرگ سلولی شوند (۸،۲۹). دپلاریزاسیون و تورم میتوکندریایی به علت نفوذپذیری غیر اختصاصی غشاء داخلی میتوکندری است (۹). معکوس کردن فاز تورم به وسیله افزودن ATP اگزوزن امکان‌پذیر است. یون Mg^{2+} نیز می‌تواند مؤثر باشد اما به تنهایی کارساز نیست و باید همراه ATP باشد. موفقیت کمی برای معکوس کردن فاز تورم القاء شده به وسیله گلوکاتایون وجود دارد. همچنین سوکروز $0.3M$ از تورم

Summary

The Inhibitory Effect of Captopril on Paraquat Toxicity in Mitochondria Isolated from the Rat Liver

Mohammadi-Bardbori A., BSc.¹, Ghazi-Khansari M., PhD.²

1. MSc. Student of Toxicology, Department of Pharmacology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran and Faculty of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran. 2. Associate Professor, Pharmacology Department, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.

Background: The aim of the present study was to show the capability of captopril as a thiol ACEi (angiotensin converting enzyme inhibitor), in suppressing mitochondrial toxicity due to paraquat.

Method: In this study, rats liver mitochondria were isolated with buffer using refrigerated centrifuge. In order to obtain the minimum toxic dose of paraquat and the effective dose of captopril, different concentrations of paraquat (1 to 100mM) and captopril (0.08 to 1mM) were investigated by determining LC_{50} , viability indices, lipid peroxidation, mitochondrial swelling, catalase activity, GSH and GSSG.

Results: Simultaneous treatment of mitochondria with captopril (0.08mM) and paraquat (5mM) significantly ameliorate the mitochondrial toxicity of paraquat (5mM) alone. Our results show that captopril is a effective antioxidant. The antioxidative action of captopril appears to be attributable to the sulphahydryl group (SH) in the compound. This effect may be due to captopril abilities to scavenge reactive oxygen species.

Conclusion: Our results indicate that Captopril can ameliorate oxidative stress induced by paraquat and therefore, can be used for the prevention and treatment of diseases caused by environmental toxins.

Key words: Paraquat, Rat liver Mitochondria, Captopril, Oxidative stress

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2006; 13(3): 132-140

References

1. Aydin S, Aral I, Kilic N, Bakan I, Aydin S, Erman F. The level of antioxidant enzymes, plasma vitamins C and E in cement plant workers. *Clin Chim Acta* 2004; 341(1-2): 193-8.
2. Babincova M, Altanerova V, Altaner E, Baeoya Z, Babinec P. Doxorubicin mediated free iron release from ferritin magnetopartitions for cancer therapy at higher temperatures: Implications for cancer therapy. *European Cells and Materials* 2002;2: 140-41.
3. Boveris A. Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. *Adv Exp Med Biol* 1977; 78: 67-82.
4. Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of microgram quantities of Protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
5. Brunner HR, Gavras H, Waeber B, Kershaw GR, Turini GA, Vukovich RA, et al. Oral angiotensin-converting enzyme inhibitor in long-term treatment of hypertensive patients. *Ann Intern Med* 1979; 90(1): 19-23.
6. Bus JS, Aust SD, Gibson JE. Superoxide- and singlet oxygen-catalyzed lipid peroxidation as a possible mechanism for paraquat (methyl viologen) toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 1974; 58(3): 749-55.
7. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 2000; 29(3-4): 222-30.
8. Cappelletti G, Maggioni MG, Candia Carnevali MD, Bonasoro F, Maci R. Dynamic changes in the state of actin polymerization in human alveolar cells exposed to the oxidant agent paraquat. *Eur J Cell Biol* 1996; 71(3): 293-302.
9. Castilho RF, Meinicke AR, Almeida AM, Hermes-Lima M, Vercesi AE. Oxidative damage of mitochondria induced by Fe(II) citrate is potentiated by Ca²⁺ and includes lipid peroxidation and alterations in membrane proteins. *Arch Biochem Biophys* 1994; 308(1): 158-63.
10. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59(3): 527-605.
11. Costantini P, Petronilli V, Colonna R, Bernardi P. On the effects of paraquat on isolated mitochondria. Evidence that paraquat causes opening of the cyclosporin A-sensitive permeability transition pore synergistically with nitric oxide. *Toxicology* 1995; 99(1-2): 77-88.
12. deCavanagh EM, Fraga CG, Ferder L, Inserra F. Enalapril and captopril enhance antioxidant defenses in mouse tissues. *Am J Physiol* 1997; 272(2pt2): 514-8.
13. Farrington JA, Ebert M, Land EJ, Fletcher K. Bipyridylum salts and related compounds. V. Pulse radiolysis studies of the reaction of paraquat radical with oxygen. Implications for the mode of action of bipyridyl herbicides. *Biochim Biophys Acta* 1973; 314(3): 372-81.
14. Forkert PG, Sylvestre PL, Poland JS. Lung injury induced by trichloroethylene. *Toxicology* 1985; 35(2): 143-60.
15. Garcia-Estrada J, Gonzalez-Perez O, Gonzalez-Castaneda RE, Martinez-Contreras A, Luquin S, de La Mora PG, et al. An alpha-lipoic acid-vitamin E mixture reduces post-embolism lipid peroxidation, cerebral infarction, and neurological deficit in rats. *Neurosci Res* 2003; 47(2): 219-24.
16. Ghazi-Khansari M, Nasiri G, Honarjoo M. Decreasing the oxidant stress from paraquat in isolated perfused rat lung using captopril and niacin. *Arch Toxicol* 2005; 79(6): 341-345.
17. Grune T, Reinheckel T, Joshi M, Davies KJ. Proteolysis in cultured liver epithelial cells during oxidative stress. Role of the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *J Biol Chem* 1995; 270(3): 2344-51.
18. Halliwell B, Gutteridge J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed., New York, Oxford University Press, 1999; PP.
19. Han D, Williams E, Cadenas E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J* 2001; 353(pt2): 411-6.
20. Hassan HM, Fridovich I. Intracellular production of superoxide radical and of hydrogen peroxide by redox active compounds. *Arch Biochem Biophys* 1979; 196(2): 385-95.
21. Jaeschke H. Glutathione disulfide as index of oxidant stress in rat liver during hypoxia. *Am J Physiol*

- 1990; 258(4pt1): G499-505.
22. Kiowski W, Zuber M, Elsasser S, Erne P, Pfisterer M, Burkart F. Coronary vasodilatation and improved myocardial lactate metabolism after angiotensin converting enzyme inhibition with cilazapril in patients with congestive heart failure. *Am Heart J* 1991; 122(5): 1382-1388.
 23. Konstam MA, Rousseau MF, Kronenberg MW, Udelson JE, Melin J, Stewart D, et al. Effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril on the long-term progression of left ventricular dysfunction in patients with heart failure. SOLVD Investigators. *Circulation* 1992; 86(2): 431-8.
 24. Lambert CE, Bondy SC. Effects of MPTP, MPP+ and paraquat on mitochondrial potential and oxidative stress. *Life Sci* 1989; 44(18): 1277-84.
 25. Lehninger AL. Reversal of various types of mitochondrial swelling by adenosine triphosphate. *J Biol Chem* 1959; 234: 2465-71.
 26. Lenaz G, Cavazzoni M, Genova ML, D'Aurelio M, Merlo Pich M, Pallotti F, et al. Oxidative stress, antioxidant defences and aging. *Biofactors* 1998; 8(3-4): 195-204.
 27. Mahvi D, Bank H, Harley R. Morphology of a naphthalene-induced bronchiolar lesion. *Am J Pathol* 1977; 86(3): 558-72.
 28. Matsumori H, Matsumoto T, Ishikawa H. Acute toxic effects of paraquat on ultrastructure of rat liver. *Acta Pathol Jpn* 1984; 34(3): 507-18.
 29. Milzani A, Dalledonne I, Vailati G, Colombo R. Paraquat induces actin assembly in depolymerizing conditions. *FASEB J* 1997; 11(4): 261-70.
 30. Mira ML, Manso CF. Alcohol and free oxygen radicals. *Acta Med Port* 1993; 6(5): 193-8.
 31. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival :Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2): 55-63.
 32. Palmira CM, Moreno AJ, Madeira VM. Mitochondrial bioenergetics is affected by the herbicide paraquat. 1995; 1229(2): 187-92.
 33. Ramasarma T. Generation of H₂O₂ in biomembranes. *Biochim Biophys Acta* 1982; 694(1): 69-93.
 34. Scheffler IE. A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion* 2000; 1(1): 3-31.
 35. Suntres ZE, Hepworth SR, Shek PN. Protective effect of liposome-associated α -tocopherol against paraquat-induced acute lung toxicity. *Biochem Pharmacol* 1992; 44(9): 1811-8.
 36. Taylor NL, Day DA, Millar AH. Environmental stress causes oxidative damage to plant mitochondria leading to inhibition of glycine decarboxylase. *J Bio Chem* 2002; 277(45): 42663.
 37. Tietze F. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal. Biochem* 1969; 27(3): 502-22.
 38. Turrens JF, Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* 1980; 191(2): 421-7.
- Mitochondrial breakage induced by the herbicide paraquat in cultured human Wang GY, Hirai K, Shimada H. lung cells. *J Electron Microsc (Tokyo)* 1992; 41(3): 181-4.