مجله دانشکده پزشکی اصفهان **مقاله پژوهشی**
سال سی‌ام/شماره ۱۹۶/هفته دوم شهریورماه ۱۳۹۱
تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۲۶ **تاریخ پذیرش:** ۹۱/۳/۹

بررسی اثر کاپتوپریل در سمیت پاراکوآت بر روی رده‌ی سلولی G292

سمیه جعفری نژاد[۱]، دکتر محمود قاضی خوانساری[۲]

چکیده

مقدمه: پاراکوآت یک علف‌کش صنعتی است که پس از ورود به سلول با تولید رادیکال فعال ایجاد آسیب سلولی می‌کند. کاپتوپریل نیز به دلیل داشتن تیول، اثرات آنتی‌اکسیدانتی دارد و سلول را از رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کند. هدف از این مطالعه، بررسی اثر مهاری کاپتوپریل بر سمیت سلولی ناشی از پاراکوآت در رده‌ی سلولی G292 بود.

روش‌ها: در این مطالعه ۴ گروه شاهد، غلظت‌های متفاوت پاراکوآت (۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌مول)، غلظت‌های متفاوت کاپتوپریل (۰/۰۳، ۰/۰۶، ۰/۱۲، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌مول) و مخلوطی از غلظت‌های ذکر شده‌ی فوق، در پلیت ۹۶ خانه حاوی ۵۰۰۰۰ سلول در هر خانه قرار داده شدند و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون آزمون‌های مربوط به سمیت بر روی آن‌ها انجام شد.

یافته‌ها: پاراکوات با غلظت ۱۰ میلی‌مولار میزان کشندگی بسیاری را در این رده‌ی سلولی موجب شد. همچنین استفاده از کاپتوپریل پس از قرار گرفتن سلول‌ها در مجاورت پاراکوات با غلظت مناسب (۰/۱۲ میلی‌مولار) درصد سلول‌های زنده را افزایش داد. نتایج حاصل از بررسی تولید نیترات نیز نشان داد که تغییر قابل ملاحظه‌ای در تولید نیتریک اکساید در حضور کاپتوپریل و پاراکوآت حاصل نشد.

نتیجه‌گیری: کاپتوپریل دارای اثر آنتی‌اکسیدانی قابل ملاحظه بر روی رده‌ی سلولی G292 می‌باشد، ولی به نظر می‌رسد مکانیسم اثر کاپتوپریل بر کاهش سمیت ناشی از پاراکوآت نمی‌تواند از طریق اثرگذاری بر تولید نیتریک اکساید باشد.

واژگان کلیدی: پاراکوآت، کاپتوپریل، آنتی‌اکسیدان

مقدمه

پاراکوآت (متیل ویولوژن) یک علف کش صنعتی است که به صورت گسترده و روزافزون در صنایع کشاورزی مورد استفاده قرار می‌گیرد و به محض ورود به انواع گونه‌های سلولی به طور آنزیماتیک احیا می‌شود و متعاقب آن در حضور اکسیژن رادیکال سوپراکسید تولید می‌کند. تولید رادیکال سوپراکسید یکی از مهم‌ترین راه‌های سمیت سلولی پاراکوآت در بسیاری از سلول‌ها است (۱). اولین مسمومیت توسط این ماده در انسان در سال ۱۹۶۶ گزارش شده است (۲) و هر ساله مواردی از مسمومیت اتفاقی و عمدی آن از سراسر جهان گزارش می‌شود. به‌دلیل آسیب ریوی جدی و همچنین با توجه به گزارش های اخیر که این سم را جزء سموم ژنوتوکسیک ضعیف و دخیل در ایجاد سرطان پوست و همین طور مؤثر در ایجاد بیماری پارکینسون می داند، این علف کش دارای اهمیت زیادی در پزشکی و سم‌شناسی می‌باشد (۶-۳). حجم توزیع پاراکوآت بالا و در حدود ۱/۶ــ۱/۲ لیتر در کیلوگرم می‌باشد و در تمامی ارگان‌ها و بافت‌های بدن به خصوص در ریه‌ها و کلیه‌ها تجمع می‌یابد. توزیع پاراکوآت از مدل Three-compartment open model تبعیت می‌کند (۸-۷). ریه‌ها پاراکوآت را به صورت

[۱] دانشجوی دکتری، گروه نانوتکنولوژی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
[۲] استاد، گروه فارماکولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر محمود قاضی خوانساری
Email: ghazikha@tums.ac.ir

اختصاصی با یک انتقال فعال و از طریق کانال های پلی‌آمینی از پلاسما به داخل خود تغلیظ می‌سازند؛ به طوری که غلظت پاراکوآت در ریه‌ها به بیش از ۱۰ برابر پلاسما می‌رسد. مطالعات انجام شده نشان داده‌اند که پاراکوآت به طور انتخابی در بافت ریه تجمع می‌یابد و منجر به تخریب بافت و ایجاد فیبروز قابل ملاحظه می‌شود (۹). به طور دقیق‌تر سمیت پاراکوآت به دلیل احیا شدن آن در داخل سلول با استفاده از دیافورز های سلولی است که حاصل آن افزایش میزان سوپراکسید داخل سلولی است (۱۰). در حضور پاراکوآت، NOS سبب انتقال الکترون به پاراکوآت و احیای آن می شود که این امر سبب تولید NO در ازای کاهش شدید تولید O_2 خواهد شد. بنابراین پاراکوآت از NOS به عنوان دیافورز خود استفاده می‌کند (۱۱).

به طور عمده اعمال فیزیولوژیک NO توسط مقادیر کم NO تولید شده توسط NOS I & III اعمال می‌شود که فرم اصلی NOS (constitutional) در سلول های اندوتلیال، مغز و دیگر ارگان‌ها می‌باشد (۱۰). در حالی که اعمال پاتولوژیک آن (که به طور معمول در حضور غلظت‌های بسیار بالای NO ایجاد می‌شود) به طور عمده توسط NOS II که فرم قابل تحریک آن می‌باشد میانجی می‌شود (۱۲). از سوی دیگر، کاپتوپریل یک داروی مهارکننده ی آنزیم مبدل آنژیوتانسین است که در کنترل فشار خون کاربرد دارد. این دارو به دلیل داشتن تیول اثرات آنتی‌اکسیدانی نیز دارد و باعث محافظت کردن سلول از آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد می‌گردد (۵-۴).

مهارکننده‌ی آنزیم مبدل آنژیوتانسین می‌تواند رهایش NO را از طریق عروق کرونری افزایش دهد که این عمل توسط مهارکننده‌های NOS همانند L-Name متوقف می‌شود (۱۳).

مهار طولانی مدت NO سبب افزایش فعالیت سیستم رنین آنژیوتانسین می‌شود (۱۴). افزایش فعالیت آنژیوتانسین در نهایت از طریق مکانیسم های متفاوتی از جمله افزایش تولید TGF-B (Transforming growth factor-beta) که در تبدیل فیبروبلاست به میوبلاست و افزایش تجمع کلاژن نقش دارد، سبب ایجاد فیبروز در ریه می‌شود (۱۵). تجویز کاپتوپریل با مهار فرایند تولید رادیکال آزاد سبب کاهش فیبروز ایجاد شده توسط اشعه در رت گردیده است (۱۶).

با توجه به اهمیت و گسترش روزافزون استفاده از پاراکوآت در صنایع کشاورزی و سمیت و توانایی قابل توجه آن در ایجاد فیبروز ریه و اهمیت فیبروز ریه از لحاظ مرگ و میر بالای ناشی از آن و عدم وجود درمان قاطع و با کفایت برای مهار این فرایند، تلاش برای دست‌یابی به اطلاعات دقیق‌تر در زمینه‌ی مکانیسم های دخیل در این فرایند و درمان آن ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر هر یک از داروهای فوق و ترکیب آن‌ها بر سمیت بر روی رده‌ی سلولی G292 بود. با توجه به انجام مطالعات گذشته بر روی رده‌های سلولی دیگر مثل PC12 (۱۷) و آگاهی از این مطلب که پاراکوات می‌تواند در بافت‌هایی غیر از کلیه و ریه نیز تجمع یابد، این طور به نظر رسید که اثر پاراکوآت بر روی رده‌های سلولی به جز ریه و کلیه نیز می‌تواند مفید باشد.

روش‌ها

تهیه‌ی سلول‌های G292 و مراحل کشت آن‌ها

سلول ها در فلاسک پلاستیکی استریل کشت داده

www.mui.ac.ir

شدند. فلاسک با یک لایه ی نازک از محیط کشت کامل RPMI-۱۶۴۰ سرم آلبومین گاوی که به وسیله ی حرارت غیر فعال شده بود و پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) تیمار گردید و در ۳۷ درجه‌ی‌سانتی گراد با دی‌اکسیدکربن ۵ درصد و رطوبت اشباع به مدت ۷۲-۴۸ ساعت انکوبه گردید. بعد از این مدت زنده بودن سلول‌ها به وسیله‌ی تریپان بلو سنجیده شد. سپس سلول‌ها به چاهک‌های ۹۶ تایی (۵۰/۰۰۰ برای هر چاهک) انتقال داده شدند تا در آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار بگیرند.

سنجش با نمک تترازولیوم (MTT)

در سنجش به وسیله‌ی MTT (۱۸) ابتدا سلول‌ها به چاهک‌های ۹۶ تایی منتقل شدند و به آن‌ها ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت اضافه گردید. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون محیط کشت حذف شد و به جای آن ۲۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف پاراکوآت (۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌مول) و کاپتوپریل (۰/۰۳، ۰/۰۶، ۰/۱۲، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌مول) در محیط کشت تازه تهیه شده، ریخته شد و سپس سلول‌ها در شرایط فوق به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردیدند. پس از آن، محلول رویی حذف شد و به جای آن ۲۰۰ میکرولیتر از محلول MTT (۰/۲ میلی‌گرم در میلی لیتر) تازه تهیه شده در محیط کشت (از محلول ذخیره‌ی ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) قرار گرفت. بعد از ۳ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد محلول رویی حذف گردید و MTT تبدیل شده به کریستال‌های فورمازون در ۲۰۰ میکرولیتر DMSO (Dimethyl sulfoxide) حل شد. بعد از چند دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق و حل شدن کامل کریستال‌ها، جذب در ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید.

سنجش با استفاده از تست نیتریک اکساید:

پس از ساخت محلول‌های Sulfanilamide solution، Nitrite standard و NED solution، ۱۵ تا ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرارگرفتند. در مرحله‌ای دیگر در دو ردیف اول ول ۹۶ تایی غیر استریل استاندارد نیتریت رقت سازی گردید. در ردیف سوم، ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه در هر ول ریخته شد (نمونه‌ی ما در واقع همان محلول رویی ول های حاوی سلول در تست MTT بود). سپس ۵۰ میکرولیتر از Sulfanilamide solution به هر نمونه و استانداردها اضافه شد. پس از گذشت ۱۰-۵ دقیقه در دمای اتاق و دور از نور ۵۰ میکرولیتر از NED solution به همه‌ی ول‌ها اضافه شد. پس از گذشت ۵ تا ۱۰ دقیقه دور از نور و در دمای اتاق تا زمان ۳۰ دقیقه، با طول موج ۵۴۸ نانومتر قرائت شدند.

محاسبه‌ی زیستی: Viability

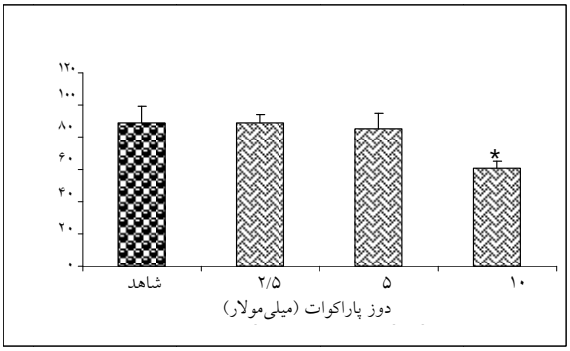
درصد Viability طبق روش شکری و همکاران (۱۹) انجام شد.

برای آنالیز آماری از آزمون‌های Student-t و ANOVA به همراه آزمون تعقیبی Newman-Keuls استفاده شد. محاسبه‌ی LC50 به وسیله‌ی نرم‌افزار GraphPad Instat انجام گرفت تا برآورد قابل تشخیصی از نتایج به دست آید. همه‌ی محاسبات به وسیله‌ی نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) انجام شد.

یافته‌ها

گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف پاراکوآت در هر دو آزمون MTT و NO نشان داد که دوز ۱۰ مولار پاراکوآت بیشترین کشندگی را بر روی سلول‌ها داشته است (شکل‌های ۱ و ۲).

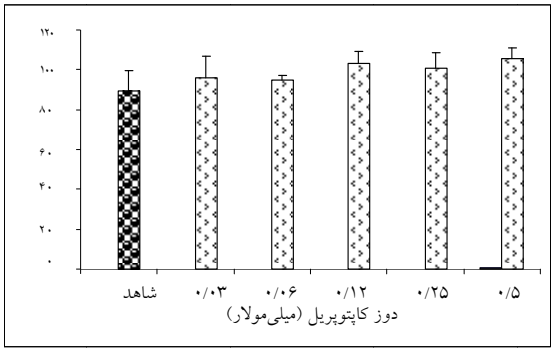
www.mui.ac.ir



شکل ۱. تعیین دوز مناسب پاراکوات بر اساس درصد سلول‌های زنده به روش MTT در رده‌ی G292

تمام داده‌ها به صورت انحراف معیار ± میانگین بیان شده‌اند.

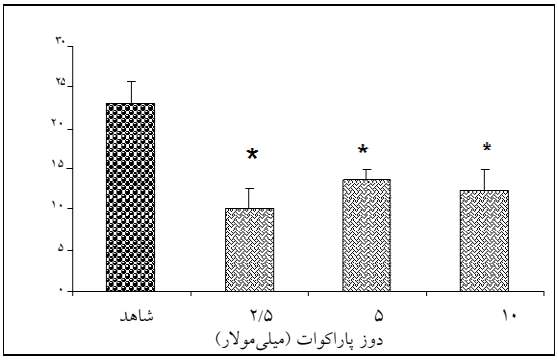
*: $P < ۰/۰۵$ نسبت به شاهد



شکل ۳. تعیین دوز مناسب کاپتوپریل بر اساس درصد سلول‌های زنده به روش MTT در رده‌ی G292

تمام داده‌ها به صورت انحراف معیار ± میانگین بیان شده‌اند.

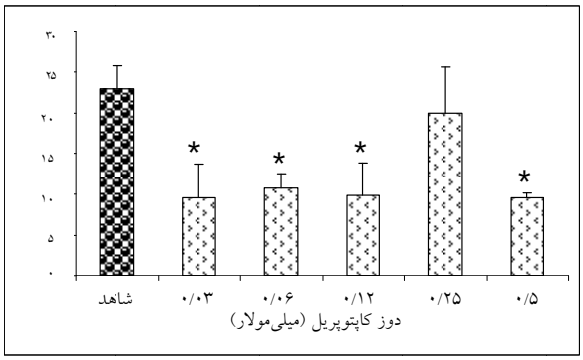
*: $P < ۰/۰۵$ نسبت به شاهد



شکل ۲. تعیین دوز مناسب پاراکوات بر اساس ارزیابی میزان تولید NO در G292

تمام داده‌ها به صورت انحراف معیار ± میانگین بیان شده‌اند.

*: $P < ۰/۰۵$ نسبت به شاهد



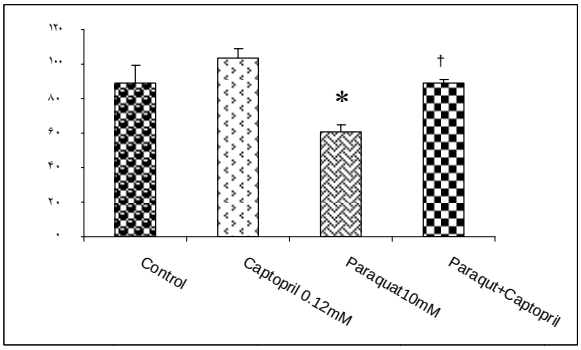
شکل ۴. تعیین دوز مناسب کاپتوپریل بر اساس ارزیابی میزان تولید NO در G292

تمام داده‌ها به صورت انحراف معیار ± میانگین بیان شده‌اند.

*: $P < ۰/۰۵$ نسبت به شاهد

گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف کاپتوپریل در هر دو آزمون MTT و NO نشان داد که دوز ۰/۱۲ میلی‌مولار کاپتوپریل کمترین کشندگی را بر روی سلول‌ها داشته است (شکل‌های ۳ و ۴).

تیمار همزمان پاراکوآت (۱۰ میلی‌مولار) و کاپتوپریل (۰/۱۲ میلی‌مولار) بهبود معنی‌داری را ($P < ۰/۰۵$) در کاهش سمیت ناشی از پاراکوآت به تنهایی در همین غلظت در هر دو آزمون MTT و NO نشان داد (شکل‌های ۵ و ۶).



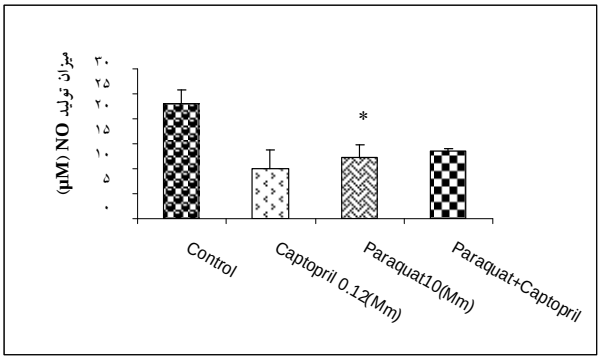
شکل ۵. اثر استفاده‌ی توأم کاپتوپریل و پاراکوات بر درصد سلول‌های زنده‌ی G292 به روش MTT

تمام داده‌ها به صورت انحراف معیار ± میانگین بیان شده‌اند.

*: $P < ۰/۰۵$ نسبت به شاهد

†: $P < ۰/۰۵$ نسبت به پاراکوآت

www.mui.ac.ir



شکل ۶. بررسی اثر استفاده‌ی توأم از کاپتوپریل و پاراکوات با استفاده از اندازه‌گیری میزان تولید NO بر روی رده‌ی G292

تمام داده‌ها به صورت انحراف معیار ± میانگین بیان شده‌اند.

*: $P < ۰/۰۵$ نسبت به شاهد

بحث

علف‌کش پاراکوآت به طور وسیعی باعث مسمومیت و مرگ و میر زیادی در بین کشاورزان و کسانی که در معرض این سم قرار دارند، می‌گردد (۲۰). عده‌ای سمیت پاراکوآت را در سیستم میکروزومی خارج میتوکندریایی دانسته‌اند (۲۱) و در مقابل گروهی دیگر میتوکندری را محل اصلی سمیت پاراکوآت می‌دانند (۲۲). عوامل مختلفی سبب ایجاد رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن می‌شوند که از جمله‌ی آن‌ها می‌توان سیستم انتقال الکترون میتوکندریایی، سیستم گزانتین اکسیداز، سیستم ایمنی و نیز منابع خارجی مانند مصرف الکل، استعمال دخانیات، اشعه، بعضی آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای ضد سرطان را نام برد.

سمیت به دست آمده از پاراکوآت مربوط به ایجاد رادیکال‌های آزاد پر انرژی اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدهای غیر اشباع در سلول می‌باشد؛ به این صورت که پراکسیداسیون لیپیدی باعث افزایش اثرات زیان‌آور از قبیل سختی غشا، شکنندگی اسموتیک، کاهش مواد درون سلولی، کاهش بقای میتوکندریایی و سیالیت غشا می گردد که در نهایت موجب نفوذپذیری غشا نسبت به H_2O_2 می‌شود (۲۳). به طور دقیق‌تر توکسیسیته ی پاراکوآت به دلیل احیا شدن آن در داخل سلول با استفاده از دیافورز های سلولی است که حاصل آن افزایش میزان سوپراکسید (O^{2-}) داخل سلولی می‌باشد. در مطالعات گذشته نشان داده شده است که NOS در ایجاد آسیب ریوی ایجاد شده توسط پاراکوآت شرکت می‌کند (۱۰). در حضور پاراکوآت NOS سبب شانت الکترون به پاراکوآت و احیای آن می شود که این امر سبب تولید NO در ازای کاهش شدید تولید O^{2-} خواهد شد. بنابراین پاراکوآت از NOS به عنوان دیافورز خود استفاده می‌کند (۱۱).

اما نتایج این مطالعه نشان داد که میزان تولید نیتریک اکساید در حضور پاراکوآت نسبت به نمونه‌ی حاوی کاپتوپریل افزایش نیافت. به طور عمده اعمال فیزیولوژیک NO توسط مقادیر کم NO تولید شده توسط NOS I & III اعمال می‌شود که فرم اصلی (constitutional) NOS در سلول های اندوتلیال و مغز و دیگر ارگان‌ها می‌باشد (۱۰)، در حالی که اعمال پاتولوژیک آن (که اغلب در حضور غلظت های بسیار بالای NO ایجاد می‌شود) به طور عمده توسط NOS II که فرم قابل تحریک آن می‌باشد، میانجی می‌شود (۱۲). در شرایط فیزیولوژیک NO می‌تواند توکسیسیته‌ی ناشی از O^{2-} را کاهش دهد. بنابراین کاهش تولید آن به دلیل NOS uncoupling می‌تواند نقش مؤثری در ایفای نقش توکسیسیته‌ی O^{2-} داشته باشد (۲۴، ۱۳-۱۲).

همچنین NO اندوژن سبب محافظت از بافت در مقابل پراکسیداسیون لیپیدها، فیبروز و تخریب می‌شود. به همین دلیل یافتن راهی برای مهار کلی NOS و یا رهانیدن آن از چنگ پاراکوآت به عنوان دیافورز

www.mui.ac.ir

می‌تواند به عنوان کلیدی برای درمان سمیت ناشی از پاراکوآت باشد. نیتریک اکساید نقشی را در تنظیم تونوسیته‌ی عروق از طریق سیستم آنژیوتانسین II انجام می‌دهد و کاهش فشار خون ایجاد شده توسط آنتاگونیست‌های رسپتور ATI می‌تواند توسط مهار نیتریک اکساید سنتتاز مهار شود (۲۴). مهم‌تر از این‌ها، این است که قرار گرفتن در معرض نیتریک اکساید، از تعداد و فعالیت چسبندگی رسپتورهای آنژیوتانسین II می‌کاهد. نیتریک اکساید به طور مستقیم بیان رسپتورهای آنژیوتانسین II تیپ I را نیز کاهش می‌دهد (۱۹).

از طرف دیگر، مطالعات نشان داده‌اند که آنتی‌اکسیدان‌ها از قبیل ویتامین E نقش مهمی در استرس اکسیداتیو دارند (۲۵). تجویز هم‌زمان کاپتوپریل و L-آرژنین به طور قابل توجهی میزان MRCC (ترکیبات زنجیره ی تنفسی میتوکندری) را که شاخص افزایش تولید رادیکال آزاد می‌باشد، کاهش می‌دهد (۱۰).

سلول در برابر رادیکال‌های آزاد به صورت آنزیماتیک و غیر آنزیماتیک دفاع می‌کند که از دسته‌ی آنزیماتیک‌ها می‌توان به کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز اشاره کرد. نقش سوپراکسید دیسموتاز تبدیل رادیکال سوپراکسید به آب اکسیژنه می‌باشد که در نهایت آب اکسیژنه توسط کاتالاز به اکسیژن مولکولی و آب تبدیل می‌گردد (۲۵). کاپتوپریل و دیگر مهارکننده‌های آنزیم مبدل آنژیوتانسین، آنزیم پپتیدیل دی پپتیداز را که آنژیوتانسین I را به آنژیوتانسین II تبدیل می‌کند، مهار می‌کنند. این آنزیم که نام دیگر آن Kininase II می باشد، برادی کینین را که یک گشادکننده‌ی عروقی قوی است، غیر فعال می‌نماید. فعالیت پایین‌آورنده‌ی فشارخون این دارو ممکن است به دلیل عمل مهاری روی سیستم رنین- آنژیوتانسین و عمل تحریکی روی سیستم کالیکرین-کینین باشد. تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که مهارکننده های آنزیم مبدل آنژیوتانسین به خصوص کاپتوپریل به دلیل داشتن گروه تیول در ساختمان خود دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و محافظت‌کنندگی سلول از آسیب ناشی از رادیکال های آزاد می‌باشند و پاراکوآت از طریق ایجاد رادیکال‌های آزاد باعث آسیب سلولی می‌شود (۲۶).

در مطالعه‌ی حاضر خاصیت آنتی‌اکسیدانی کاپتوپریل برای پیش‌گیری و درمان ضایعات ناشی از پاراکوآت در In vitro بررسی شد. معیارهای متفاوتی جهت درک وضعیت آسیب و یا عدم آسیب سلولی در نظر گرفته می‌شود مانند میزان درصد سلول‌های زنده به روش MTT، بررسی میزان تولید NO در محلول رویی، بررسی فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در محلول رویی و بررسی میزان چسبندگی سلولی که در این مقاله به بررسی وضعیت آسیب ها از دو روش اول پرداخته شد. روش MTT برای تعیین درصد بقای سلول ها و شمارش سلولی کاربرد فراوانی دارد؛ به طوری که میتوکندری‌های سلول‌های زنده که دارای آنزیم‌های دهیدروژناز می باشند، قادر هستند نمک زرد رنگ تترازولیوم را به کریستال های فورمازون بنفش رنگ تبدیل کنند (۲۷).

نتایج نشان داد که پاراکوآت با غلظت ۱۰ میلی‌مولار میزان کشندگی بسیاری را در رده‌ی سلولی مورد نظر در هر دو آزمون MTT و NO موجب شد. به عبارت دیگر، Viability در رده ی سلولی مورد نظر نسبت به شاهد کاهش چشمگیری داشت. این در

www.mui.ac.ir

حالی بود که استفاده از کاپتوپریل پس از قرار گرفتن سلول‌ها در مجاورت پاراکواآت با غلظت مناسب (۰/۱۲میلی‌مولار) میزان درصد سلول های زنده را افزایش داد که تأییدکننده ی نتایج به دست آمده از مطالعات قبلی است (۲۸، ۱۸). بنابراین این نتیجه بیان‌کننده‌ی اثر احیاکنندگی و به عبارتی اثر آنتی‌اکسیدانی کاپتوپریل است، هر چند مکانیسم عمل آن به طور دقیق مشخص نیست؛ چرا که همان طور که قابل مشاهده است میزان تولید نیتریک اکساید در حضور توأم پاراکوآت و کاپتوپریل در مقایسه با شرایطی که فقط پاراکوآت حضور داشت، کاهش معنی‌داری نیافت. به نظر می‌رسد مکانیسم اثر کاپتوپریل بر کاهش سمیت ناشی از پاراکوآت از طریق اثرگذاری بر تولید نیتریک اکساید نباشد.

با توجه به نتایج به دست آمده، کار بر روی آنتاگونیست‌های آنزیم مبدل آنژیوتانسین و همچنین استفاده از سایر مهارکننده های آنزیم مبدل آنژیوتانسین که فاقد گروه SH می‌باشند، می‌تواند مکانیسم عمل دقیق‌تر آن را نشان دهد.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه ی انجام طرح شماره ی ۸۶-۰۱-۳۰-۵۱۰۱ مصوب شده در دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران می‌باشد. این تحقیق در آزمایشگاه کشت سلولی گروه فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است. نویسندگان این مقاله از همکاری خانم‌ها دکتر مریم کاکنج و جمیله اسماعیلی کمال تشکر را دارند.

References

1. Farrington JA, Ebert M, Land EJ, Fletcher K. Bipyridylium quaternary 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.
2. Bullivant CM. Accidental poisoning by paraquat: Report of two cases in man. Br Med J 1966; 1(5498): 1272-3.
3. Californai Environmental Protection Agency. Summary of toxicology. Paraquat dichloride. Department of pesticide Regolation Medical Toxicology Branch; 1993.
4. Liou HH, Tsai MC, Chen CJ, Jeng JS, Chang YC, Chen SY, et al. Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan. Neurology 1997; 48(6): 1583-8.
5. US EPA. Reregistration Eligibility Decision (RED). Paraquat dichloride. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances; 1997.
6. Wesseling C, van Wendel de JB, Ruepert C, Leon C, Monge P, Hermosillo H, et al. Paraquat in developing countries. Int J Occup Environ Health 2001; 7(4): 275-86.
7. Hawksworth GM, Bennett PN, Davies DS. Kinetics of paraquat elimination in the dog. Toxicol Appl Pharmacol 1981; 57(2): 139-45.
8. Ellenhorn MJ, Schonwald S, Ordog G, Wasserberger J. Ellenhorn's medical toxicology: diagnosis and treatment of human poisoning. 2nd ed. Philadelphia: Williams & Wilkins; 1997.
9. Smith LL. Mechanism of paraquat toxicity in lung and its relevance to treatment. Hum Toxicol 1987; 6(1): 31-6.
10. Margolis AS, Porasuphatana S, Rosen GM. Role of paraquat in the uncoupling of nitric oxide synthase. Biochim Biophys Acta 2000; 1524(2-3): 253-7.
11. Darr D, Combs S, Murad S, Pinnell S. Studies on the inhibition of collagen synthesis in fibroblasts treated with paraquat. Arch Biochem Biophys 1993; 306(1): 267-71.
12. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev 1991; 43(2): 109-42.
13. Bernatova I, Pechanova O, Pelouch V, Simko F. Regression of chronic L -NAME-treatment-induced left ventricular hypertrophy: effect of captopril. J Mol Cell Cardiol 2000; 32(2): 177-85.
14. Lasky JA, Ortiz LA. Antifibrotic therapy for the treatment of pulmonary fibrosis. Am J Med Sci 2001; 322(4): 213-21.

www.mui.ac.ir

15. Clark JG. The molecular pathology of pulmonary fibrosis. In: Uitto J, Pereida AJ, editors. Connective tissue disease. London: Taylor & Francis; 1987. p. 321-43.
16. Ghazi-Khansari M, Mohammadi-Bardbori A. Captopril ameliorates toxicity induced by paraquat in mitochondria isolated from the rat liver. Toxicol In Vitro 2007; 21(3): 403-7.
17. Mohammadi-Bardbori A, Nejati M, Esmaeili J, Ghafari H, Ghazi-Khansari M. Comparative Measurement of In Vitro Paraquat and Aflatoxin B1 Cytotoxicity Using Three Different Cytotoxicity Assays in Pheochromocytoma Cells (PC-12). Toxicol Mech Methods 2008; 18(9): 685-9.
18. Skehan P, Friedman SJ. A rapid naphthol yellow S method for measuring the cellular protein content of anchorage cultures. In Vitro Cell Dev Biol 1985; 21(5): 288-90.
19. Shokri F, Heidari M, Gharagozloo S, Ghazi-Khansari M. In vitro inhibitory effects of antioxidants on cytotoxicity of T-2 toxin. Toxicology 2000; 146(2-3): 171-6.
20. Lambert CE, Bondy SC. Effects of MPTP, MPP+ and paraquat on mitochondrial potential and oxidative stress. Life Sci 1989; 44(18): 1277-84.
21. Milzani A, Dalledonne I, Vailati G, Colombo R. Paraquat induces actin assembly in depolymerizing conditions. FASEB J 1997; 11(4): 261-70.
22. 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.
23. Oliver MH, Harrison NK, Bishop JE, Cole PJ, Laurent GJ. A rapid and convenient assay for counting cells cultured in microwell plates: application for assessment of growth factors. J Cell Sci 1989; 92 (Pt 3): 513-8.
24. Hung KT, Chang CJ, Kao CH. Paraquat toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. Journal of Plant Physiology 2002; 159(2): 159-66.
25. Mohammadi-Bardbori A, Ghazi-Khansari M. Nonthiol ACE inhibitors, enalapril and lisinopril are unable to protect mitochondrial toxicity due to paraquat. Pesticide Biochemistry and Physiology 2007; 89(2): 163-7.
26. 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.
27. Klein-Soyer C, Duclos B, Fricker JP, Denni M, Cazenave JP. Rapid and sensitive photometric quantification of the proliferation of adherent vascular endothelial and smooth muscle cells in 96-multiwell plates after may-grunwald giemsa staining. Nouv Rev Fr Hematol 1987; 29(5): 311-5.
28. Elmi A, Sadeghi Z, Elmi S, Daraei B, Ghazi-Khansari M. Hepatoprotective role of captopril on paraquat induced hepatotoxicity. Hum Exp Toxicol 2007; 26(10): 789-94.

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol. 30, No. 196, 2nd week, September 2012 Received: 14.4.2012 Accepted: 29.5.2012

Evaluation of the Effects of Captopril on Cytotoxicity of Paraquat in G292 Cell Line

Somayeh Jafarinejad MSc[1], Mahmoud Ghazi-khansari PhD[2]

Abstract

Background: Paraquat is a kind of herbicide which can cause cell damage by producing active radicals. On the other hand, the antioxidant activity of captopril due to its thiol content prevents cell damage caused by active radicals. The aim of this study was to evaluate the inhibitory effect of captopril on paraquat toxicity in G292 cell line.

Methods: This study included 4 groups of control, different concentrations of paraquat (2.5, 5, and 10 mM), different concentrations of captopril (0.03, 0.06, 0.12, 0.25, and 0.5 mM), and combination of paraquat and captopril with different concentrations. The cells were placed in the well of 96-well tissue culture microplates with the density of 50,000 cells in each well. After 24 hours of incubation, toxicity tests were performed.

Findings: Captopril increased the viability of cells in methylthiazol tetrazolium (MTT) assay but it did not have significant effects on nitric oxide production. It could also significantly reduce the cytotoxicity of paraquat.

Conclusion: Although the antioxidant activity of captopril reduced the cytotoxicity of paraquat in G292 cell line, this reduction was not found to be related with nitric oxide production.

Keywords: Paraquat, Captopril, Antioxidant

[1] PhD Student, Department of Medical Nanotechnology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[2] Professor, Department of Pharmacology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Corresponding Author: Mahmoud Ghazi Khansari PhD, Email: ghazikha@tums.ac.ir