DOI: 10.22122/jims.v36i504.10470 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و ششم/شماره‌ی ۵۰۴/هفته‌ی چهارم دی ۱۳۹۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۴/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۹/۲۰ تاریخ چاپ: ۱۳۹۷/۱۰/۲۲

بررسی اثر محافظتی تلمیزارتان بر آسیب ژنومی ناشی از آرسنیک در محیط برون تن

ندا خرسندی[۱]، محمود اعتباری[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: استفاده از آب‌های آشامیدنی آلوده به آرسنیک، از مهم‌ترین راه‌های مواجهه با آن است و یک عامل خطر مهم برای بروز انواع سرطان‌ها و بیماری‌ها می‌باشد. آرسنیک، از طریق تولید رادیکال‌های فعال و آسیب به DNA سبب سرطان‌زایی می‌شود. داروی ضد فشار خون تلمیزارتان، سبب کاهش استرس اکسیداتیو و التهاب می‌شود و دارای اثرات محافظتی در ژنوم سلول‌ها می‌باشد. این تحقیق، اثر محافظتی تلمیزارتان بر آسیب ژنومی آرسنیک را با روش Comet بررسی نمود.

روش‌ها: ابتدا سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسان با غلظت‌های (۰/۰۱، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میکرومولار) تلمیزارتان به مدت ۲۴ ساعت پیش‌درمان شدند و پس از آن، با سدیم متاآرسنیت ۱ میکرومولار به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. آسیب ژنتیکی و اثرات محافظتی توسط روش Comet بررسی شد. ابتدا، مخلوط سوسپانسیون سلولی و آگارز بر روی لام قرار گرفت. سپس، مراحل مختلف روش Comet انجام و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی گردید و نمونه‌ها توسط میکروسکوپ فلورسانس ارزیابی شدند. از هر لام، ۱۰۰ سلول به طور تصادفی انتخاب و پارامترهای آسیب و محافظت بررسی شدند.

یافته‌ها: نتایج حاکی از افزایش معنی‌دار ($P < ۰/۰۰۱$) پارامترهای طول دم (۰/۴۶ ± ۲۲/۳۳ پیکسل)، درصد DNA در دم (۰/۷۸ ± ۲۴/۵ درصد) و گشتاور دم (۰/۲۴ ± ۵/۵۹ پیکسل درصد) در سلول‌های انکوبه شده با آرسنیک در مقایسه با گروه شاهد (به ترتیب ۰/۱۹ ± ۲/۱۱ پیکسل، ۰/۴۸ ± ۴/۳۸ درصد و ۰/۰۱ ± ۰/۱۰ پیکسل درصد) بود. کاهش معنی‌دار ($P < ۰/۰۰۱$) این پارامترها (به ترتیب ۰/۱۵ ± ۲/۴۶ پیکسل، ۰/۹۵ ± ۹/۵۱ درصد و ۰/۰۴ ± ۰/۳۳ پیکسل درصد) پس از پیش درمانی سلول‌ها با تلمیزارتان (۱۰ میکرومولار) و به صورت وابسته به دز در مقایسه با گروه آرسنیک دیده شد.

نتیجه‌گیری: تلمیزارتان آسیب DNA ناشی از آرسنیک را در محیط برون تن کاسته و دارای پتانسیل کاهش خطر بروز سرطان در افراد در تماس با آرسنیک می‌باشد.

واژگان کلیدی: تلمیزارتان، آرسنیک، آسیب ژنومی، روش Comet

ارجاع: خرسندی ندا، اعتباری محمود. **بررسی اثر محافظتی تلمیزارتان بر آسیب ژنومی ناشی از آرسنیک در محیط برون تن.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۷؛ ۳۶ (۵۰۴): ۱۳۸۸-۱۳۸۲

مقدمه

آرسنیک عنصری شبه‌فلز و با فراوانی زیاد در طبیعت است و به عنوان آفت‌کش، علف‌کش، محافظ چوب و دارو در درمان لوکمی کاربرد دارد. آرسنیک، از جمله مهم‌ترین منابع آلودگی شناخته شده در صنایع مختلف است. مهم‌ترین راه مواجهه با آرسنیک از طریق نوشیدن آب آلوده می‌باشد. مواجهه‌ی مزمن با آن باعث بروز بیماری‌های قلبی و عروقی، مشکلات پوستی و عصبی و افزایش آنزیم‌های کبدی شد می‌شود و احتمال سرطان‌های کلیه، کبد و ریه را افزایش می‌دهد (۲-۱). آرسنیک با تولید گونه‌های فعال اکسیژن و رادیکال‌های آزاد و از طریق شکست رشته‌های DNA، تولید میکرونوکلئوس و مهار ترمیم DNA باعث آسیب به ژنوم سلول و ایجاد سرطان می‌شود (۳).

در تحقیقی که بر روی سلول‌های ریه انجام شد، آرسنیک به صورت وابسته به دز موجب افزایش شکست دو رشته‌ای در DNA و افزایش آسیب کروموزومی شده است (۴). مطالعه‌ی دیگری نشان داد که آرسنیک در سلول‌های بیضه‌ی موش‌های مواجه شده با آن از طریق افزایش استرس اکسیداتیو و کاهش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، موجب آسیب ژنومی شده است (۵). در مطالعه‌ی برون‌تن بر روی سلول‌های اپی‌تلیال کلیه‌ی انسان، آرسنیک به صورت وابسته به دز موجب افزایش آسیب DNA شده است (۶). فشار خون بالا، یک عامل مهم مرگ و میر در جهان می‌باشد و میزان افزایش فشار خون

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه فارماکولوژی و توکسیکولوژی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه فارماکولوژی و توکسیکولوژی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: محمود اعتباری

Email: etebari@pharm.mui.ac.ir

با دز و زمان مواجهه با آرسنیک ارتباط مستقیمی دارد (۸-۷).

فعال شدن سیستم رنین- آنژیوتانسین و تولید آنژیوتانسین II از طریق تحریک گیرنده‌ی ATR_1 سبب ایجاد التهاب و استرس اکسیداتیو می‌شود. تلمیزارتان که یک آنتاگونیست انتخابی و طولانی اثر بر روی ATR_1 است که ضمن کاهش فشار خون، سبب کاهش سیتوکاین‌های التهابی می‌شود. در مطالعه‌ای که بر روی موش‌ها به منظور کاهش اثرات سمیت کبدی تتراکلرید کربن انجام شده است تلمیزارتان به صورت وابسته به دز و به ترتیب با مقادیر ۱، ۳ و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم از وزن بدن با افزایش سطح گلوتاتیون و آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از ژنوم سلول محافظت می‌کند (۹). در تحقیق دیگر بر روی موش‌های مبتلا به دیابت شده توسط استرپتوزوتوسین از دزهای ۳، ۶ و ۱۲ میلی‌گرم/کیلوگرم از وزن حیوان تلمیزارتان استفاده شده است که موجب کاهش آسیب ژنومی در سلول‌های جنسی موش گردیده است (۱۰).

اثرات آنتی‌اکسیدانی و جاروب کردن رادیکال‌های آزاد توسط تلمیزارتان مستقل از اثر آن بر گیرنده اعمال می‌شود (۱۱). در مطالعات دیگر، مشخص شده است که تلمیزارتان با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی خود می‌تواند سبب کاهش آسیب کلیه و سمیت قلبی ناشی از دانوروبیسین شود (۱۳-۱۲). در پژوهش‌های درون‌تن، اثرات محافظتی تلمیزارتان بر سمیت کبدی ناشی از تتراکلریدکربن و استامینوفن و کاهش آنزیم‌های کبدی، کاهش پر اکسیداسیون لیپیدها و بهبود بافت در مقاطع هیستوپاتولوژیک مشخص شده است (۱۴، ۹).

Arumugam و همکاران، نشان دادند که تلمیزارتان با هدف‌گیری سیتوکاین‌های التهابی همچون Tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) و اینترلوکین‌های ۱ و ۶ می‌تواند کولیت حاد القا شده توسط سدیم دکستران سولفات را بهبود بخشد (۱۵). Kushwaha و Jena بهبود سطوح گلوتاتیون و سوپراکسید دیسموتاز کاهش یافته در موش‌های مبتلا به دیابت شده توسط استرپتوزوتوسین و کاهش آسیب به DNA به دنبال تجویز تلمیزارتان را گزارش دادند (۱۰). همچنین، مطالعات حیوانی نشان داده است که تلمیزارتان می‌تواند میزان آسیب ناشی از آرسنیک در بیضه و کبد را کاهش دهد (۱۷-۱۶).

تکنیک‌های زیادی شامل آزمون Ames، آزمون میکرونوکلئوس، آزمون انحراف کروموزومی و آزمون‌های درون‌تن و برون‌تن دیگری برای ارزیابی میزان آسیب ژنومی ناشی از داروها، سموم و بیماری‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (۱۸). روش ارزیابی Comet (Comet assay) یک روش حساس، سریع، ارزان قیمت و ارزشمند جهت مطالعه بر روی سلول‌های یوکاریوت در محیط برون‌تن و درون‌تن می‌باشد و قادر است کمترین میزان آسیب به ژنوم سلول‌های منفرد را نشان دهد. تصاویر به دست‌آمده از این روش، شبیه به یک ستاره‌ی دنباله‌دار (Comet) است که شامل یک سر مجزا و دم می‌باشد. سر از DNA سالم تشکیل شده است؛ در حالی که دم شامل DNA آسیب دیده یا تکه‌های شکسته شده‌ی DNA می‌باشد. پارامتر طول دم (Tail length)، نشان دهنده‌ی میزان مهاجرت قطعات DNA متناسب با اندازه‌ی شکست است و پارامتر درصد DNA موجود در دم (%DNA in tail) میزان آسیب را مشخص می‌کند. پارامتر گشتاور دم (Tail moment) نیز مضربی از این دو پارامتر می‌باشد. این سه پارامتر، جهت مطالعات آسیب به DNA و محافظت از آن به طور مکرر استفاده شده است (۲۰-۱۹).

در این مطالعه، با توجه به این که آرسنیک دارای اثرات آسیب به DNA می‌باشد و همچنین، مواجهه با آن می‌تواند سبب افزایش فشار خون گردد، به عنوان ترکیب ژنوتوکسیک مورد استفاده قرار گرفت و بر اساس گزارش‌های موجود، در خصوص اثرات آنتی‌اکسیدانی و محافظتی داروی ضد فشار خون تلمیزارتان، اثرات احتمالی محافظت ژنی تلمیزارتان بر آسیب ژنومی ناشی از آرسنیک برای اولین بار بررسی شد. برای رسیدن به این هدف، سطح آسیب به DNA در سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسان (Human umbilical vein endothelial cells یا HUVECs)که با آرسنیک و تلمیزارتان مواجهه یافتند، با استفاده از روش Comet بررسی و پارامترهای پیش‌گفته اندازه‌گیری شدند.

روش‌ها

جهت انجام این تحقیق، ابتدا داروی تلمیزارتان (Telmisartan) از شرکت Glenmark کشور هند تهیه و در حلال دی‌متیل سولفوکساید (Dimethyl sulfoxide یا DMSO) حل شد و بر اساس مطالعات قبلی، غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میکرومولار از آن تهیه گردید (۲۲-۲۱). ترکیب سدیم متاآرسنیت (Sodium meta arsenite یا $NaAsO_2$) خریداری شده از شرکت Sigma در غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار آماده شد. مطالعه‌ی حاضر، به روش برون‌تن بر روی سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسان (HUVECs) که از مرکز تحقیقات بیولوژیک ایران (Iranian Biological Resource Center یا IBRC) گرفته شد، در گروه فارماکولوژی و توکسیکولوژی دانشکده‌ی داروسازی اصفهان انجام پذیرفت. این سلول‌ها در محیط کشت غنی از گلوکز (Dulbecco's modification of Eagle medium یا DMEM) کشت داده شد.

در بخش اول، جهت تعیین غلظت ایمن و غیر ژنوتوکسیک تلمیزارتان، سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت با غلظت‌ها و محیط کشت پیش‌گفته در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و میزان دی‌اکسید کربن ۵ درصد انکوبه شدند.

جدول ۱. نتیجه‌ی بررسی ژنوتوکسیسیته‌ی غلظت‌های مختلف سدیم آرسنیت بر روی سلول‌های Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)

مواجهه	طول دم (پیکسل) میانگین ± انحراف معیار	درصد DNA موجود در دم (درصد) میانگین ± انحراف معیار	گشتاور دم (پیکسل درصد) میانگین ± انحراف معیار
شاهد منفی	۲/۱۱ ± ۰/۱۹	۴/۳۸ ± ۰/۴۸	۰/۱ ± ۰/۰۱
سدیم آرسنیت (۰/۱ میکرومولار)	۱۱/۹۱ ± ۰/۳۷*	۱۸/۹ ± ۰/۸۱*	۲/۲۹ ± ۰/۱۴*
سدیم آرسنیت (۱ میکرومولار)	۲۲/۳۳ ± ۰/۴۶*	۲۴/۵ ± ۰/۷۸*	۵/۵۹ ± ۰/۲۴*
سدیم آرسنیت (۱۰ میکرومولار)	۲۶/۲۶ ± ۰/۴۳*	۲۹/۲۳ ± ۰/۹۴*	۶/۸۲ ± ۰/۲۵*

مقایسه‌ی پارامترهای آسیب به DNA در مواجهه‌ی سلول‌های Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) با غلظت‌های مختلف سدیم آرسنیت به مدت ۲۴ ساعت با گروه شاهد منفی. نماد * نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار ($P < ۰/۰۰۱$) در مقایسه با گروه شاهد است.

در مرحله‌ی بعد، برای تعیین حداقل غلظت مناسب ژنوتوکسیک از سدیم متاآرسنیت، سلول‌ها با غلظت‌های متفاوت از آن به مدت ۲۴ ساعت مواجه شدند. در بخش سوم، جهت بررسی اثرات احتمالی محافظت ژنی تلمیزارتان، پس از انکوباسیون اولیه‌ی سلول‌ها با تلمیزارتان به مدت ۲۴ ساعت، مواجهه با حداقل غلظت آسیب‌رسان از سدیم متاآرسنیت نیز به مدت ۲۴ ساعت صورت پذیرفت. در هر مرحله، سلول‌هایی که هیچ گونه مواجهه‌ای نداشتند، به عنوان گروه شاهد منفی جهت مقایسه‌ی سایر گروه‌ها با آن‌ها در نظر گرفته شدند.

بر روی سلول‌ها، روش ارزیابی Comet در مراحل زیر انجام شد. ابتدا، لام‌های روکش داده شده با آگارز نرمال آماده گردید. سپس، سلول‌ها به ترتیب تریپسینه، سانتریفیوژ و شمارش شدند و با آگارز نقطه‌ی ذوب پایین (Low melting point agarose یا LMPA) مخلوط گردیدند و بر روی لام‌ها قرار گرفتند. در مراحل بعد، لام‌ها در محلول قلیایی جهت تجزیه شدن قرار گرفتند و با استفاده از بافر الکتروفورز، جدا شدن رشته‌های DNA صورت پذیرفت. الکتروفورز در شرایط ۲۵ ولت و ۳۰۰ میلی‌آمپر انجام گردید. از اتیدیوم بروماید جهت رنگ‌آمیزی استفاده شد. سپس، سلول‌های رنگ‌آمیزی شده توسط میکروسکوپ فلورسانس مشاهده و تصویربرداری گردید. از تصاویر مربوط به هر مرحله، حداقل ۱۰۰ سلول انتخاب و توسط نرم‌افزار Comet score پارامترهای طول دم، درصد DNA موجود در دم و گشتاور دم جهت واکاوی آماری استفاده گردید. هر یک از این ارزیابی‌ها، در روزهای مختلف سه مرتبه تکرار شد (۲۳).

نتایج به دست‌آمده در نرم‌افزار GraphPad Prism واکاوی و به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شدند. مقایسه‌ی آماری بین گروه‌های مختلف با استفاده از آزمون One-way ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey برای تشخیص تفاوت بین گروه‌های مختلف انجام شد. $P < ۰/۰۵۰$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. مدت زمان لازم برای انجام آزمایش‌ها پس از آماده‌سازی مواد و وسایل، سه ماه بود.

یافته‌ها

نتایج ارزیابی آسیب به DNA توسط سدیم آرسنیت نشان داد که پارامترهای طول دم، درصد DNA موجود در دم و گشتاور دم در همه‌ی غلظت‌های مورد مطالعه دارای اختلاف آشکار و معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد بود ($P < ۰/۰۰۱$) و سبب ژنوتوکسیسیته شده بود. از طرف دیگر، میزان آسیب به صورت وابسته به دز افزایش یافت و غلظت ۲۰ میکرومولار نیز منجر به مرگ سلولی شد (جدول ۱). غلظت یک میکرومولار از سدیم متاآرسنیت جهت ایجاد آسیب در DNA به عنوان غلظت مناسب در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

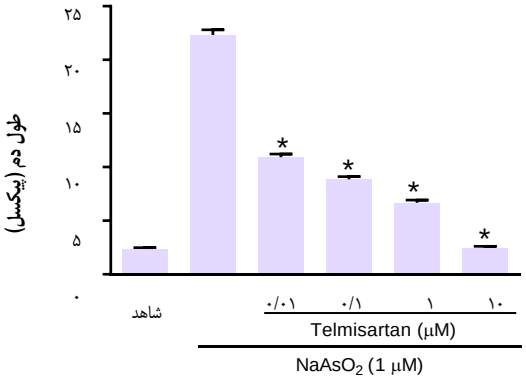
نتایج بررسی اثرات غلظت‌های مورد مطالعه از تلمیزارتان نشان دهنده‌ی غیر ژنوتوکسیک بودن آن‌ها بر اساس پارامترهای آسیب به DNA در تمامی غلظت‌های مورد بررسی بود (جدول ۲). نتایج در مقایسه با گروه شاهد هیچ گونه تفاوت آماری را نشان نداد.

جدول ۲. نتیجه‌ی بررسی ایمنی غلظت‌های مختلف تلمیزارتان بر روی سلول‌های Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)

مواجهه	طول دم (پیکسل) میانگین ± انحراف معیار	درصد DNA موجود در دم (درصد) میانگین ± انحراف معیار	گشتاور دم (پیکسل درصد) میانگین ± انحراف معیار
شاهد منفی	۲/۱۱ ± ۰/۱۹	۴/۳۸ ± ۰/۴۸	۰/۱۰ ± ۰/۰۱
تلمیزارتان (۰/۰۱ میکرومولار)	۱/۹۴ ± ۰/۱۰	۴/۶۶ ± ۰/۶۶	۰/۱۳ ± ۰/۰۲
تلمیزارتان (۰/۱ میکرومولار)	۲/۰۹ ± ۰/۱۹	۶/۳۱ ± ۰/۶۹	۰/۱۵ ± ۰/۰۲
تلمیزارتان (۱ میکرومولار)	۲/۰۹ ± ۰/۱۸	۶/۲۳ ± ۰/۶۹	۰/۱۵ ± ۰/۰۲
تلمیزارتان (۱۰ میکرومولار)	۲/۱۴ ± ۰/۱۹	۶/۵۴ ± ۰/۶۷	۰/۱۵ ± ۰/۰۲

مقایسه‌ی پارامترهای آسیب به DNA در مواجهه‌ی سلول‌های Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) با غلظت‌های مختلف تلمیزارتان به مدت ۲۴ ساعت با گروه شاهد منفی. تمامی پارامترهای تلمیزارتان فاقد اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه شاهد است.

نتایج انکوبه کردن اولیه (Pre-Treatment) سلول‌های انـدوتلیال ورید بند ناف انسان (HUVECs) به مدت ۲۴ ساعت با غلظـت‌هـای ۰/۰۱، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میکرومـولار از تلمیزارتـان و سـپس، مواجهـه‌ی سلول‌ها با غلظت ژنوتوکسیک از سدیم متاآرسنیت (۱ میکرومولار) به مدت ۲۴ ساعت پس از شستشوی سلول‌ها و انجـام روش Comet و ارزیابی پارامترهـای طـول دم (شـکل ۱)، درصـد DNA موجـود در دم (شکل ۲) و گشتاور دم (شکل ۳) و مقایسه‌ی آن‌ها بـا گـروه مواجهـه با سدیم متاآرسنیت به تنهـایی بـه عنـوان گـروه شـاهد مثبـت، نشـان دهنـده‌ی اخـتلاف معنـی‌دار و تأییـد اثـرات محافظـت ژنـی تمـامی غلظت‌های تلمیزارتان بود.



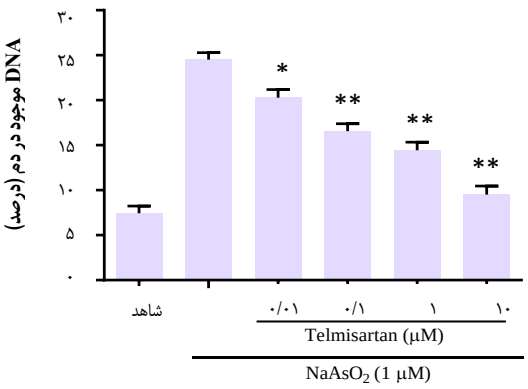
شکل ۱. مقایسه‌ی طول دم در بررسی اثر محافظت ژنی غلظت‌های مختلف تلمیزارتان در مقابل غلظت یک میکرومولار سدیم متاآرسنیت

مقایسه‌ی طول دم در گروه‌هایی که با غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میکرومولار تلمیزارتان به مدت ۲۴ ساعت پیش از مواجهه با غلظت ۱ میکرومولار از سدیم متاآرسنیت (Sodium meta arsenite یا $NaAsO_2$) انکوبه شده و با سدیم متاآرسنیت به‌عنوان شاهد مثبت مقایسه شده‌اند. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارایه شده است.

علامت * نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار ($P < ۰/۰۰۱$) در مقایسه با گروه سدیم متاآرسنیت است.

بحث

آرسنیک، عنصری است که در همه جای طبیعت یافت مـی‌شـود و در مورد آن، مطالعات متعددی در شهرهای مختلف ایران نیز انجـام شـده است. نمونه‌گیری و بررسـی آب‌هـای سـطحی اطـراف معـدن طـلای موتـه‌ی اصـفهان، نشـان دهنـده‌ی وجـود آلـودگی در آب ناشـی از فعالیت‌های استخراج معدن بوده است (۲۴). مطالعات دیگـری کـه در استان کردستان انجام شـده اسـت، نشـان دهنـده‌ی بـالا بـودن میـزان آرسنیک در آب‌های سطحی بیش از حـد مجـاز تعیـین شـده توسـط سازمان بهداشت جهانی بوده است.

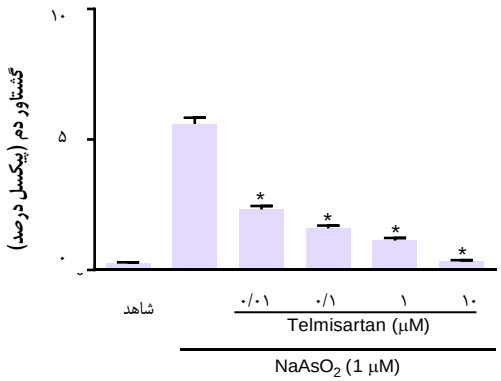


شکل ۲. مقایسه‌ی درصد DNA در دم در بررسی اثر محافظت ژنی غلظت‌های مختلف تلمیزارتان در مقابل غلظت ۱ میکرومولار سدیم متاآرسنیت

مقایسه‌ی درصد DNA موجود در دم در گروه‌هایی که با غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میکرومولار تلمیزارتان به مدت ۲۴ ساعت پیش از مواجهه با غلظت ۱ میکرومولار از سدیم متاآرسنیت (Sodium meta arsenite یا $NaAsO_2$) انکوبه شده و با سدیم متاآرسنیت به عنوان شاهد مثبت مقایسه شده‌اند. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار آمده است.

علامت‌های * و ** به ترتیب نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار ($P < ۰/۰۵۰$) و ($P < ۰/۰۰۱$) در مقایسه با گروه سدیم متاآرسنیت هستند.

همچنین، در نتیجه‌ی مواجهه‌ی مزمن با آرسـنیک، بیمـاری‌هـایی مانند ضایعات پوستی، کراتوزیس، رنگ‌دانه‌ای شدن پوسـت، خطـوط ایجاد شده بر روی انگشت و ناخن و قطع عضو بدن به دلیل گـانگرن در این استان دیده شده است (۲۵).



شکل ۳. مقایسه‌ی گشتاور دم در بررسی اثر محافظت ژنی غلظت‌های مختلف تلمیزارتان در مقابل غلظت ۱ میکرومولار سدیم متاآرسنیت

مقایسه‌ی گشتاور دم در گروه‌هایی که با غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میکرومولار تلمیزارتان به مدت ۲۴ ساعت پیش از مواجهه با غلظت ۱ میکرومولار از سدیم متاآرسنیت (Sodium meta arsenite یا $NaAsO_2$) انکوبه شده و با سدیم متاآرسنیت به عنوان شاهد مثبت مقایسه شده‌اند. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار ارایه شده است.

علامت * نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار ($P < ۰/۰۰۱$) در مقایسه با گروه سدیم متاآرسنیت است.

در استان قزوین، ارتباط مستقیمی بین بالا بودن آلودگی آب‌های سطحی ناشی از آرسنیک و ابتلا به فشار خون بالا و دیابت شیرین گزارش شده است (۲۶). تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species یا ROS) توسط آرسنیک و از طریق ایجاد شکست در رشته‌های DNA، مهار ترمیم آن و جابه‌جایی کروماتیدهای خواهری، موجب آسیب به DNA و در نتیجه، افزایش خطر بروز سرطان‌های مختلف می‌شود (۲).

در مطالعه‌ی حاضر، سلول‌های وریدبند ناف انسان پس از ۲۴ ساعت مواجهه با آرسنیک دچار آسیب ژنومی شده‌اند که به طور معنی‌داری با گروه شاهد منفی تفاوت دارد (جدول ۱) و با نتایج حاصل از تحقیق برون‌تن بر روی سلول‌های تخمدان موش چینی مشابه است (۲۷). مطالعه‌ی درون‌تن بر روی لنفوسیت خون ساکنین آسام جنوبی در کشور هندوستان نیز تأیید کننده‌ی نتایج این مطالعه و ژنوتوکسیک بودن آرسنیک می‌باشد (۲۸). در این مطالعه، با افزایش غلظت آرسنیک میزان آسیب ژنومی نیز افزایش یافت و دارای رابطه‌ی مستقیم دز- پاسخ بود که با نتایج به دست‌آمده از بررسی آسیب ژنومی بر روی سلول‌های لنفوسیت T و سلول‌های لوکمی انسانی در تحقیقات برون‌تن مشابه است (۳۰-۲۹). در غلظت ۲۰ میکرومولار بر روی سلول‌ها، اثر سیتوتوکسیک مشاهده شد. مطالعاتی که بر روی سلول‌های ریه و سلول‌های بنیادی مزانشیمال چربی انسان به صورت برون‌تن انجام شده است (۴)، تأیید کننده‌ی اثر سیتوتوکسیک آرسنیک می‌باشد، اما میزان اثر سیتوتوکسیک با توجه به نوع رده‌ی سلولی، غلظت مورد استفاده و مدت زمان مواجهه متفاوت است. در مطالعه‌ی حاضر، برای نخستین بار بروز اثرات ژنوتوکسیک آرسنیک به صورت وابسته به دز و اثر سیتوتوکسیک در دزهای بیش از ۲۰ میکرومولار در سلول‌های اندوتلیال وریدبند ناف انسان (HUVECs) به روش Comet که یک روش حساس و سریع بود و کمترین میزان آسیب ژنومی را نشان داد، تأیید شد.

تلمیزارتان، آنتاگونیست انتخابی و طولانی اثر بر روی گیرنده‌ی AT_1 و آگونیست نسبی بر روی زنوسنسور Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-γ) است که دارای خواص ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی نیز می‌باشد (۱۴-۱۳). در تحقیق حاضر، تلمیزارتان هیچ گونه آسیب ژنومی معنی‌داری بر روی سلول‌ها نداشت که با نتایج به دست‌آمده از آزمون Comet اسپرم موش‌های مبتلا به دیابت شده توسط استرپتوزوتوسین، مشابه است (۱۰). در مطالعات مختلف، اثرات محافظت ژنی تلمیزارتان از طریق کاهش سیتوکاین‌های پیش التهابی و استرس اکسیداتیو ناشی از دکستران سولفات سدیم و استرپتوزوتوسین گزارش شده است (۱۵، ۱۰) که تأیید کننده‌ی نتیجه‌ی به دست آمده از مطالعه‌ی حاضر می‌باشد که در آن تلمیزارتان نقش محافظتی در برابر آسیب ژنومی ناشی از آرسنیک داشته است. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که در مواجهه‌ی سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت با تلمیزارتان و مقایسه با گروه شاهد منفی، با بررسی پارامترهای مختلف آسیب ژنومی، داروی تلمیزارتان در غلظت‌های مورد مطالعه ایمن می‌باشد (جدول ۲).

از طرف دیگر، آسیب ژنومی در سلول‌هایی که ابتدا با تلمیزارتان پیش انکوبه شدند و پس از آن با سدیم متاآرسنیت مواجه شدند، به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه سدیم متاآرسنیت به عنوان گروه ژنوتوکسیک کاهش یافته است. در این تحقیق، برای اولین بار اثرات محافظت سلولی داروی ضد فشار خون تلمیزارتان در مقابل اثرات آسیب به DNA آرسنیک در رده‌ی سلولی HUVEC در شرایط برون‌تن توسط روش Comet مورد تأیید قرار گرفت. تحقیقات بیشتری برای ارزیابی این اثر در شرایط درون‌تن مورد نیاز است تا بتوان از طریق تجویز تلمیزارتان، سلول‌های بدن انسان را در برابر آسیب ژنومی ناشی از آرسنیک محافظت کرد.

تشکر و قدردانی

مطالعه‌ی حاضر، مربوط به پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد سم‌شناسی است که با کد ۳۹۶۶۵۶ در شورای پژوهشی دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی به تصویب رسید.

References

1. Chung JY, Yu SD, Hong YS. Environmental source of arsenic exposure. J Prev Med Public Health 2014; 47(5): 253-7.
2. Bustaffa E, Stoccoro A, Bianchi F, Migliore L. Genotoxic and epigenetic mechanisms in arsenic carcinogenicity. Arch Toxicol 2014; 88(5): 1043-67.
3. Kumar M, Lalit M, Thakur R. Natural antioxidants against arsenic-induced genotoxicity. Biol Trace Elem Res 2016; 170(1): 84-93.
4. Xie H, Huang S, Martin S, Wise JP, Sr. Arsenic is cytotoxic and genotoxic to primary human lung cells. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen 2014; 760: 33-41.
5. Ince S, Avdatek F, Demirel HH, Arslan-Acaroz D, Goksel E, Kucukkurt I. Ameliorative effect of polydatin on oxidative stress-mediated testicular damage by chronic arsenic exposure in rats. Andrologia 2016; 48(5): 518-24.
6. Chai CY, Huang YC, Hung WC, Kang WY, Chen WT. Arsenic salt-induced DNA damage and expression of mutant p53 and COX-2 proteins in SV-40 immortalized human uroepithelial cells.

Mutagenesis 2007; 22(6): 403-8.
7. Abhyankar LN, Jones MR, Guallar E, Navas-Acien A. Arsenic exposure and hypertension: a systematic review. Environ Health Perspect 2012; 120(4): 494-500.
8. Grossman A, Messerli FH, Grossman E. Drug induced hypertension--An unappreciated cause of secondary hypertension. Eur J Pharmacol 2015; 763(Pt A): 15-22.
9. Atawia RT, Esmat A, Elsherbiny DA, El-Demerdash E. Telmisartan ameliorates carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats. Environ Toxicol 2017; 32(2): 359-70.
10. Kushwaha S, Jena GB. Telmisartan ameliorates germ cell toxicity in the STZ-induced diabetic rat: studies on possible molecular mechanisms. Mutat Res 2013; 755(1): 11-23.
11. Shao J, Nangaku M, Inagi R, Kato H, Miyata T, Matsusaka T, et al. Receptor-independent intracellular radical scavenging activity of an angiotensin II receptor blocker. J Hypertens 2007; 25(8): 1643-9.
12. Arozal W, Watanabe K, Veeraveedu PT, Thandavarayan RA, Harima M, Sukumaran V, et al. Effect of telmisartan in limiting the cardiotoxic effect of daunorubicin in rats. J Pharm Pharmacol 2010; 62(12): 1776-83.
13. Arozal W, Watanabe K, Veeraveedu PT, Ma M, Thandavarayan RA, Sukumaran V, et al. Telmisartan prevents the progression of renal injury in daunorubicin rats with the alteration of angiotensin II and endothelin-1 receptor expression associated with its PPAR-gamma agonist actions. Toxicology 2011; 279(1-3): 91-9.
14. Fouad AA, Al-Mulhim AS, Jresat I, Gomaa W. Therapeutic role of telmisartan against acetaminophen hepatotoxicity in mice. Eur J Pharmacol 2012; 693(1-3): 64-71.
15. Arumugam S, Sreedhar R, Thandavarayan RA, Giridharan VV, Karuppagounder V, Pitchaimani V, et al. Telmisartan treatment targets inflammatory cytokines to suppress the pathogenesis of acute colitis induced by dextran sulphate sodium. Cytokine 2015; 74(2): 305-12.
16. Fouad AA, Albuali WH, Al-Mulhim AS, Jresat I. Protective effect of telmisartan treatment against arsenic-induced testicular toxicity in rats. Z Naturforsch C 2015; 70(7-8): 175-81.
17. Fouad AA, Al-Mulhim AS, Jresat I. Telmisartan treatment attenuates arsenic-induced hepatotoxicity in mice. Toxicology 2012; 300(3): 149-57.
18. Williams GM. Methods for evaluating chemical genotoxicity. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1989; 29: 189-211.
19. McNamee JP, Bellier PV. Use of a standardized JaCVAM in vivo rat comet assay protocol to assess the genotoxicity of three coded test compounds; ampicillin trihydrate, 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride, and N-nitrosodimethylamine. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen 2015; 786-788: 158-64.
20. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environ Mol Mutagen 2000; 35(3): 206-21.
21. Cianchetti S, Del Fiorentino A, Colognato R, Di Stefano R, Franzoni F, Pedrinelli R. Anti-inflammatory and anti-oxidant properties of telmisartan in cultured human umbilical vein endothelial cells. Atherosclerosis 2008; 198(1): 22-8.
22. Fukami K, Yamagishi S, Kaifu K, Matsui T, Kaida Y, Ueda S, et al. Telmisartan inhibits AGE-induced podocyte damage and detachment. Microvasc Res 2013; 88: 79-83.
23. Ghassemi-Barghi N, Etebari M, Jafarian-Dehkordi A. Protective effect of amifostine on busulfan induced DNA damage in human hepatoma cells. Toxicol Mech Methods 2017; 27(1): 52-7.
24. Keshavarzi B, Moore F, Rastmanesh F, Kermani M. Arsenic in the Muteh gold mining district, Isfahan, Ira. Environ Earth Sci 2012; 67: 959-70.
25. Barati AH, Maleki A, Alasvand M. Multi-trace elements level in drinking water and the prevalence of multi-chronic arsenical poisoning in residents in the west area of Iran. Sci Total Environ 2010; 408(7): 1523-9.
26. Mahram M, Shahsavari D, Oveisi S, Jalilolghadr S. Comparison of hypertension and diabetes mellitus prevalence in areas with and without water arsenic contamination. J Res Med Sci 2013; 18(5): 408-12.
27. Dopp E, Hartmann LM, Florea AM, von Recklinghausen U, Pieper R, Shokouhi B, et al. Uptake of inorganic and organic derivatives of arsenic associated with induced cytotoxic and genotoxic effects in Chinese hamster ovary (CHO) cells. Toxicol Appl Pharmacol 2004; 201(2): 156-65.
28. Roy P, Mukherjee A, Giri S. Evaluation of genetic damage in tobacco and arsenic exposed population of Southern Assam, India using buccal cytome assay and comet assay. Ecotoxicol Environ Saf 2016; 124: 169-76.
29. Yedjou C, Sutton L, Tchounwou P. Genotoxic mechanisms of arsenic trioxide in human Jurkat T-lymphoma cells. Met Ions Biol Med 2008; 10: 495-9.
30. Yedjou CG, Tchounwou PB. In-vitro cytotoxic and genotoxic effects of arsenic trioxide on human leukemia (HL-60) cells using the MTT and alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assays. Mol Cell Biochem 2007; 301(1-2): 123-30.

DOI: *10.22122/jims.v36i504.10470* *Published by Vesnu Publications*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 36, No. 504, 4th Week, January 2019**

Received: 17.07.2018 Accepted: 11.12.2018 Published: 12.01.2019

In Vitro Evaluation of Protective Effect of Telmisartan on Arsenic-Induced Genotoxicity

Neda Khorsandi[1], Mahmoud Etebari[2]

Original Article

Abstract

Background: Drinking of arsenic-contaminated water is one the most important ways of exposing human to this element, considering that as a substantial risk factor for the occurrence of various types of cancers and diseases. Carcinogenesis of arsenic has been attributed to its genetic toxicity and DNA damage through production of reactive oxygen free radicals. Telmisartan, as an antihypertensive drug, has antioxidant, anti-inflammatory, cytoprotective, and genoprotective properties. In this study, we studied the probable genoprotective effect of telmisartan on DNA damage caused by arsenic in human umbilical cord vein cells.

Methods: At first, the human umbilical vein endothelial cells pretreated with different concentrations of telmisartan (0.01, 0.1, 1, and 10 µM) for 24 hours. Then, the cells incubated with 1 µM sodium meta arsenite ($NaAsO_2$) for 24 hours, and parameters of DNA damage were evaluated using comet assay method. The mixture of cells and agarose was put on slides, and after several steps of comet method, we stained them with ethidium bromide. The cells were examined under a fluorescent microscope. For each condition, 100 randomly selected cells on each slide could be scored, and DNA damage parameters were assessed.

Findings: There was significant increase in tail length (22.33 ± 0.46 pixels), %DNA in tail (24.5 ± 0.78 percent), and tail moment (5.59 ± 0.24 pixels percent) in arsenic-incubated cells compared to the control group (2.11 ± 0.19 pixels, 4.38 ± 0.48 percent, and 0.10 ± 0.01 pixels percent, respectively) ($P < 0.001$ for all). Significant decrease of above parameters of genotoxicity (2.46 ± 0.15 pixels, 9.51 ± 0.95 percent, and 0.33 ± 0.04 pixels percent, respectively) were observed after the pretreatment of cells with telmisartan (10 µM) for 24 hours as compared to the exposed cells with arsenic ($P < 0.001$ for all).

Conclusion: Telmisartan reduces DNA damage caused by arsenic in vitro, and potentially can reduces the risk of cancer due to arsenic exposure.

Keywords: Telmisartan, Arsenic, DNA damage, Comet assay

Citation: Khorsandi N, Etebari M. **In Vitro Evaluation of Protective Effect of Telmisartan on Arsenic-Induced Genotoxicity.** J Isfahan Med Sch 2019; 36(504): 1382-8.

1- MSc Student, Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Associate Professor, Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Mahmoud Etebari, Email: etebari@pharm.mui.ac.ir