بررسی اثر محافظتی کاپتوپریل در جلوگیری از آسیب اکسیداتیو مت‌آمفتامین در میتوکندری ایزوله از قلب رت تحت درجه حرارت بالا

محمد شکرزاده [۱و۲](Ph.D)، احسان زمانی [۱و۲](Pharm.D)، جواد ملاحسنی [۱و۲](Pharm.D)، فاطمه شکی [۱و۲*](Ph.D)

۱- مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲- گروه سم‌شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

چکیده

سابقه و هدف: مت‌آمفتامین (METH) یک داروی سوء مصرف شناخته شده با سمیت قلبی می‌باشد. کاپتوپریل یک مهارکننده آنزیم مبدل آنژیوتانسین است که در درمان فشارخون استفاده می‌شود و اثرات آنتی‌اکسیدانی بارزی نشان داده است. هدف این مطالعه، بررسی اثرات کاپتوپریل علیه سمیت قلبی القاشده توسط METH در میتوکندری ایزوله شده از قلب رت را در شرایط دمای بالا بود.

مواد و روش‌ها: میتوکندری قلب رت ویستار با روش سانتریفیوژ متعدد ایزوله گردید. سپس با METH (LC50,۲۵۰μM) و کاپتوپریل (۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ μM) در دمای ۳۷درجه و ۴۱درجه انکوبه گردید. بعداز یک ساعت انکوباسیون، آسیب میتوکندریایی به وسیله تست MTT اندازه‌گیری شد. مارکرهای استرس اکسیداتیو نیز بررسی گردیدند.

یافته‌ها: نتایج نشان می‌دهند که METH موجب آسیب معنادار میتوکندری در شرایط دمایی بالا گردید. مارکرهای استرس اکسیداتیو مثل لیپید پراکسیداسیون، تولید گونه‌های فعال اکسیژن و اکسیدشدن گلوتاتیون در میتوکندری ایزوله در تماس با METH گزارش شدند که در شرایط دمایی ۴۱درجه معنادارتر از ۳۷درجه بود.کاپتوپریل موجب کاهش معنادار اکسیداتیو استرس القا شده توسط METH در میتوکندری ایزوله، گردید. هم‌چنین پیش درمان با کاپتوپریل به صورت معنادار عمل‌کرد میتوکندری را بهبود بخشید.تورم میتوکندریایی نیز بعداز تماس با METH مشاهده گردید که به‌طور معنادار توسط پیش درمان باکاپتوپریل کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان دادند کاپتوپریل می‌تواند از استرس اکسیداتیو و آسیب میتوکندریایی القا شده با METH مخصوصاً در شرایط دمایی بالا جلوگیری کند. لذا تاثیر این آنتی‌اکسیدان در درمان سمیت قلبی ناشی از METH باید بررسی گردد.

واژه‌های کلیدی: کاپتوپریل، مت‌آمفتامین، سمیت قلبی، میتوکندری، استرس اکسیداتیو، موش بزگ آزمایشگاهی

مقدمه

آمفتامین و مت‌آفتامین از مهم‌ترین داروهای مورد سوء مصرف در سراسر جهان است که به خصوص در جوانان شیوع بیش‌تری دارد [۱]. استفاده از این دارو منجر به عوارض مختلفی می‌شود که بیش‌تر سیستم قلبی عروقی و دستگاه عصبی مرکزی را در گیر کرده و منجر به مشکلات قلبی، سایکوز، تشنج، افزایش درجه حرارت و... می‌شود [۳،۲]. مطالعات مختلف نشان داده است که در طولانی‌مدت این

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۱۲۵۵۹۰۵۱

Email: fshaki.tox@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۲/۱۱

داروها سبب نقص در سیستم دوپامینرزیک و سروتونرژیک می‌شود [۴].

مطالعات اخیر نشان داده است که تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) یکی از عوامل آسیب‌رسان در مصرف آمفتامین‌ها به خصوص در تجویز دوزهای بالای آمفتامین و آنالوگ‌هایش است [۶،۵] و تجویز آنتی‌اکسیدانت‌ها سبب کاهش آسیب دوپامینرژیک ناشی از آمفتامین‌ها شده است [۷-۱۰].

منابع مختلفی برای ROS در سلول وجود دارد که می‌تواند توسط آمفتامین‌ها فعال شوند اما بررسی‌ها نشان داد که زنجیره انتقال الکترون میتوکندری مهم‌ترین منبع داخل سلولی ROS است [۱۱]. آمفتامین‌ها ممکن است تولید ROS را از طریق افزایش عمل‌کرد پایه‌ی میتوکندری افزایش دهند. از طرفی آمفتامین‌ها سبب افزایش آزادسازی دوپامین می‌شود که دوپامین به خاطر افزایش اتواکسیداسیون از طریق واکنش فنتون به عنوان منبع تولید ROS شناخته می‌شود [۱۲].

یکی دیگر از مشکلات مصرف آمفتامین‌ها افزایش درجه حرارت بدن است که در افزایش تولید ROS در بدن نقش دارد [۱۳] و نشان داده شده است که جلوگیری از افزایش درجه حرارت ناشی از آمفتامین‌ها در کاهش تولید ROS موثر بوده است [۵].

زنجیره انتقال الکترون به افزایش درجه حرارت بدن حساس است و در مطالعه‌ای بر روی hamster V79 cells مصرف اکسیژن با افزایش درجه حرارت تا ۴۰ درجه به طور قابل توجهی افزایش یافت که منجر به تغییر در عمل‌کرد زنجیره انتقال الکترون و افزایش تولید ROS شد [۱۵،۱۴]. بنابراین افزایش درجه حرارت بدن ناشی از آمفتامین‌ها ممکن است از طریق اختلال در زنجیره انتقال الکترون منجر به افزایش تولید ROS می‌شود و علاوه براین افزایش درجه حرارت منجر به مصرف بیش‌ترATP سلولی می‌شود که منجر به شیفت سلول به سمت مرگ نکروز می‌شود [۱۶].

اثرات سمی مت آمفتامین بر روی سیستم قلبی – عروقی قابل توجه است .به طوری که مصرف این آمفتامین‌ها سبب ایجاد بی‌نظمی قلبی عروقی، خونریزی داخل جمجمه‌ای، احتقان قلبی و مرگ ناگهانی می‌شود هم‌چنین مت‌آمفتامین‌ها، تکثیر لنفوسیت‌ها را متوقف نموده و سبب مرگ لنفوسیت‌های طحال و تیموس نیز می‌شوند [۱۵،۱۴].

کاپتوپریل یکی از معروف‌ترین و پرمصرف‌ترین داروهای قلبی–عروقی است که با مهار آنزیم تبدیل‌کننده آنژیوتنسین I به II باعث پیشگیری از ایجاد آنژیونسین II که یک تنگ‌کننده عروقی قوی و بالا برنده فشارخون است، می‌شود، هم‌چنین باعث کاهش آلدسترون و افزایش برادی کینین که یک گشادکننده عروقی است می‌شود [۱۷]. مطالعات نشان داده است که کاپتوپریل باعث بهبود فیبروز و استرس–اکسیداتیو در محیط in vitro و درمان با کاپتوپریل موجب افزایش سطح آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی و غیر آنزیمی در بافت‌های مختلف موش سوری شده است [۱۸]. این اثرات آن‌ها مستقل از توانایی آن‌ها در کاهش فشار خون است [۱۹]. کاپتوپریل به دلیل دارا بودن گروه تیول می‌تواند به عنوان یک آنتی‌اکسیدان در کاهش سمیت میتوکندریایی ناشی از مواد تولیدکننده رادیکال‌های آزاد موثر باشد [۲۰].

میتوکندری یک تنظیم‌کننده‌ی مهم عمل‌کرد سلول است و بنابراین اختلال در عمل‌کرد میتوکندری در پاتوژنز بسیاری از بیماری‌ها نقش دارد [۲۱]. به همین دلیل، مطالعه‌ی عمل‌کرد میتوکندری اهمیت زیادی در طیف وسیعی از تحقیقات بالینی و پایه دارد. یک ابزار ارزشمند در بررسی عمل‌کرد میتوکندری استفاده از میتوکندری ایزوله است. میتوکندری‌ها برای حفظ و نگه‌داری هموستاز سلول‌ها ضروری است و مسئول تولید مقادیر بالای ATP است که برای عمل‌کرد سلول‌های قلبی لازم می‌باشد [۲۱].

بنابراین با توجه به اهمیت نقش میتوکندری در بافت قلب و این‌که مت‌آمفتامین سبب آسیب در این بافت حیاتی بدن می‌شود و جهت بررسی نقش افزایش درجه حرارت در آسیب اکسیداتیو ناشی از مصرف مت‌آمفتامین‌ها، ما در این مطالعه به بررسی اثر محافظتی کاپتوپریل در جلوگیری از آسیب

میتوکندری‌های قلب در تماس با مت آمفتامین تحت درجه حرارت بالا پرداختیم.

مواد و روش‌ها

جامعه مورد بررسی- روش نمونه‌گیری. مطالعه از نوع تجربی- آزمایشگاهی است. موش‌های صحرایی نر از جنس Wistar(وزن بدن محدوده gr ۲۰۰-۲۵۰) تحت شرایط استاندارد با دسترسی به آب و غذا نگهداری گردید. تمام آزمایشات برطبق توصیه کمیته اخلاق بر روی حیوانات در دانشکده داروسازی ساری انجام گردید.

جداسازی میتوکندری از قلب. از رت نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم که در شرایط استاندارد از نظر دسترسی به آب و غذا و سیکل۱۲ ساعته روشنایی و تاریکی نگهداری شدند، استفاده شد. حیوانات ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایشات ناشتا نگهداشته می‌شدند. کلیه آزمایش‌های انجام شده، باتوجه به دستورالعمل‌های ثبت شده در کمیته آزمایشات حیوانی دانشگاه علوم پزشکی مازندارن، ساری ایران صورت گرفت. رت‌ها را با اتر بی‌هوش کرده و بلافاصله قلب را خارج کرده و در بافر شست وشو داده شدند و سپس بافت هموژن تهیه شد. بافت هموژن شده را ابتدا با سرعت ۲۰۰۰ x g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس ۱۰۰۰۰ x g به‌مدت ۱۰ دقیقه محلول رویی را با سرعت سانتریفیوژ کرده و محلول رویی را دور ریخته و رسوب ته لوله را که حاوی میتوکندری است را در بافر سرد پراکنده شد.

میتوکندری‌ها با غلظت LC50 آمفتامین (غلظتی که باعث از کار افتادن ۵۰ درصد میتوکندری‌ها می‌شود) در دمای ۳۷ و ۴۱ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت در تماس بودند و سپس فاکتورهای آسیب بررسی شد. در موارد استفاده از ماده‌ی محافظ، ۵ دقیقه میتوکندری‌ها با این ماده پیش تیمار خواهند شد و سپس سم اضافه می‌شود. هر آزمایش شش بار تکرار شد.

اندازه‌گیری غلظت پروتئین. روش اندازه‌گیری غلظت پروتئین با کوماسی بلو همان روش برادفورد بوده که محدوده سنجش غلظت پروتئین ml/µg ۲۰۰-۲۰۰۰ می‌باشد [۲۲].

ارزیابی سمیت میتوکندریایی با تست MTT. سمیت میتوکندریایی بر اساس اندازه‌گیری میزان احیای MTT توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز انجام شد. آنزیم سوکسینات دهیدروژناز، یک آنزیم میتوکندریایی است که در هنگام اختلال در عمل‌کرد میتوکندری از کار افتاده و تبدیل MTT به ترکیب بنفش رنگ فورمازون صورت نمی‌گیرد. میتوکندری‌های ایزوله از قلب رت با غلظت‌های مختلف مت‌آمتامین یا مت‌آمفتامین به علاوه کاپتوپریل در دماهای ۳۷ و ۴۱ درجه سانتی‌گراد تماس داده شده و بعد از یک ساعت انکوباسیون، ۱۰۰µL ازسوسپانسیون میتوکندری در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شده و سپس معرف MTT را اضافه کرده و به دور از نور به مدت نیم ساعت انکوبه شد. کریستال‌های فورمازون تشکیل شده را با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر از DMSO حل کرده و سپس جذب نمونه‌ها را در ۵۷۰ نانومتر با استفاده از الایزاریدر خوانده شد. درصد تغییر در فعالیت آنزیم با سنجیدن جذب گروه‌ها در برابر جذب گروه کنترل محاسبه شد [۲۳].

اندازه‌گیری هیدروژن پراکساید با فلوریمتری. میتوکندری‌ها در دماهای ۳۷ و ۴۱ درجه‌ی سانتی‌گراد در بافر تنفسی (۰/۳۲ mM Mops, ۲۰mM Tris, ۱۰mM sucrose, ۵۰ µM EGTA, ۰/۵ mM MgC and ۱۲ mM KH_2PO_4/۱) با سوبسترای سوکسینات پراکنده کردیم. سپس معرف DCFH-DA (غلظت نهایی ۱۰ Mµ) و غلظت‌های مختلف سم و ماده محافظ به هر نمونه اضافه شده و در انکوباتور ۳۷ و ۴۱ درجه انکوبه شد بعد از یک ساعت انکوباسیون، ۰/۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون با ۲ میلی‌لیتر از بافر رقیق شد و با دستگاه فلوریمتری در طول موج تحریکی ۵۰۰nm و نشری ۵۲۰ nm شدت فلورسانس را اندازه‌گیری کردیم [۲۴].

اندازه‌گیری میزان لیپید پراکسیداسیون. پراکسیداسیون لیپیدی بر اساس روش تیوبابیتوریک اسید اندازه‌گیری شد. بدین ترتیب که به ml ۰/۲ از سوسپانسیون میتوکندریائی ml ۰/۱ از معرف TBA شامل HCl ۰/۵ نرمال، TCA ۱۵٪ و TBA 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 n۰/۲ml - بوتانل اضافه کرده و خوب تکان داده و سپس در ۳۵۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کردیم. لایه n - بوتانل برای سنجش در طول موج ۵۳۲ nm جدا شده و مقدار TBARsاز روی منحنی استاندارد محاسبه گردید [۲۵].

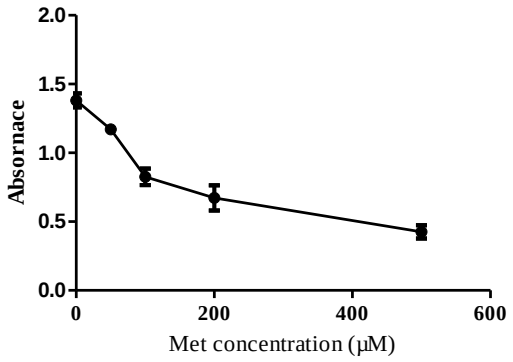
اندازه‌گیری گلوتاتیون میتوکندری. یک میلی‌لیتر از میتوکندری را برداشته و به آن ۰/۲۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۲۰٪ اضافه کرده و بعد از ورتکس کردن به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۰۰۰ x g سانتریفیوژ می‌کنیم. یک میلی‌لیتر از محلول کرده و ۱۵ دقیقه انکوبه می‌کنیم تا واکنش کامل شود سپس میزان جذب را در طول موج ۴۱۲ نانومتر خواندیم [۲۶].

اندازه‌گیری تورم میتوکندری. میتوکندری‌های به‌دست آمده، در بافر تورم که حاوی ساکارز (۷۰mM)، مانیتول (۲۳۰mM)، HEPES (۳mM)، تریس (۲ mM)، سوکسینات (۵ mM) و روتنون (۱ µM) است به حالت سوسپانسیون درآورده و در طول موج ۵۴۰nm جذب اندازه‌گیری شد [۲۷].

آنالیز آماری. نتایج بر حسب میانگین± انحراف معیار حاصل از شش بار تکرار گزارش شده و همه‌ی آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS مدل ۲۰ انجام خواهد شد. تست‌های آماری مورد استفاده شامل one-way ANOVA test با پست تست Tukey استفاده می‌شود. حد معناداری P<۰/۰۵ تعریف شده است.

نتایج

همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، به منظور دستیابی به LC50 مت‌آمفتامین (غلظتی که سبب از کار افتادن ۵۰ درصد میتوکندری‌ها می‌شود)، میتوکندری‌های ایزوله از قلب با غلظت‌های مختلف مت‌آمفتامین تماس داده شد که در نهایت غلظت ۲۵۰ µM به عنوان LC50 تعیین و در آزمایشات بعدی استفاده شد.

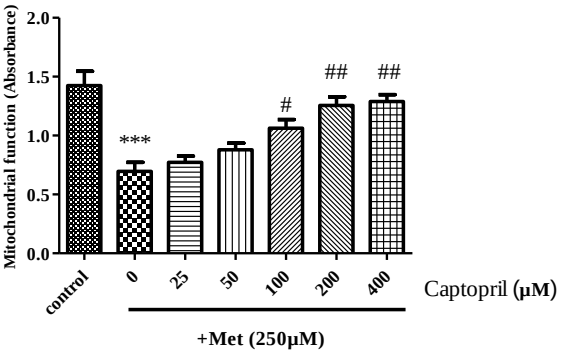


شکل ۱. منحنی دوز – پاسخ اثرات مت آمفتامین روی عملکرد میتوکندری های ایزوله از قلب رت. فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز، در میتوکندری های ایزوله شده از قلب رت بعد از تماس بامت آمفتامین (Met) با استفاده از تست MTT سنجیده شد. نتایج به صورت Mean±SD حاصل از شش بار تکرار آزمایش گزارش شده است.

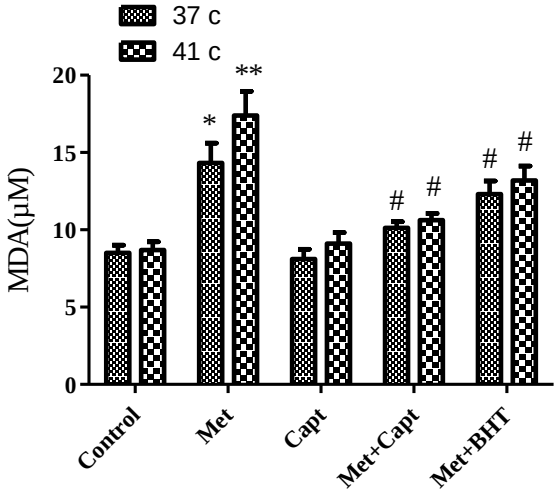
تماس با مت‌آمفتامین سبب کاهش معنادار در فعالیت میتوکندری‌های شد که در شرایط انکوباسیون در دمای ۴۱ درجه، کاهش فعالیت میتوکندری بیش‌تر بود. درصد میتوکندری‌های فعال در گروه دریافت‌کننده مت‌آمفتامین به همراه کاپتوپریل نسبت به گروه دریافت‌کننده مت‌آمفتامین به تنهایی افزایش معنی‌داری داشته است. هم‌چنین از BHT که یک آنتی‌اکسیدانت شناخته شده است به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. نتایج نشان داد اثرات محافظتی کاپتوپریل نسبت به BHT بهتر بود (شکل ۲).

میزان لیپیدپراکسیداسیون، در میتوکندری‌های ایزوله شده از بافت قلب رت در شکل ۳ نشان داده شده است. بیش‌ترین میزان لیپیدپراکسیداسیون، در گروه در تماس با مت‌آمفتامین (دمای ۴۱ درجه) مشاهده شد که در گروه دریافت‌کننده کاپتوپریل، کاهش معنادار در میزان لیپیدپراکسیداسیون نسبت به گروه مت‌آمفتامین مشاهده شد. هم‌چنین کاپتوپریل اثرات

بهتری را نسبت به BHT در کاهش لیپیدپراکسیداسیون ناشی از مت‌آمفتامین نشان داد.

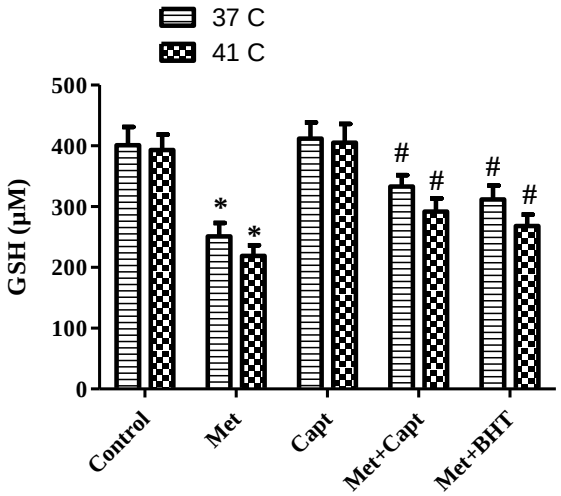


شکل ۲. اثرات محافظتی کاپتوپریل روی سمیت میتوکندریایی مت آمفتامین در میتوکندری های ایزوله از قلب رت. عملکرد میتوکندری های ایزوله شده از قلب رت بعد از تماس بامت آمفتامین (Met)و کاپتوپریل با استفاده از تست MTT سنجیده شد. نتایج به صورت Mean±SD حاصل از شش بار تکرار آزمایش گزارش شده است. ***: نشان دهنده ی اختلاف معنادار با گروه کنترل است (P<0.001). #: نشان دهنده ی اختلاف معنادار با گروه کنترل است (P<0.05). ##: نشان دهنده ی اختلاف معنادار با گروه کنترل است (P<0.01).



شکل ۳. تاثیر کاپتوپریل بر میزان لیپیدپراکسیداسیون در میتوکندری های در تماس با مت آمفتامین. غلظت MDA بر حسب میکرو مولار مالون دی آلدهید حاصل از شش بار تکرار آزمایش به صورت میانگین و انحراف معیار بیان شده است. *: نشان دهنده ی اختلاف معنادار با گروه کنترل است (P<۰,۰۵). **: نشان دهنده ی اختلاف معنادار با گروه کنترل است (P<۰,۰۱). # : نشان دهنده ی اختلاف معنادار با گروه مت آمفتامین است(P<۰,۰۵).

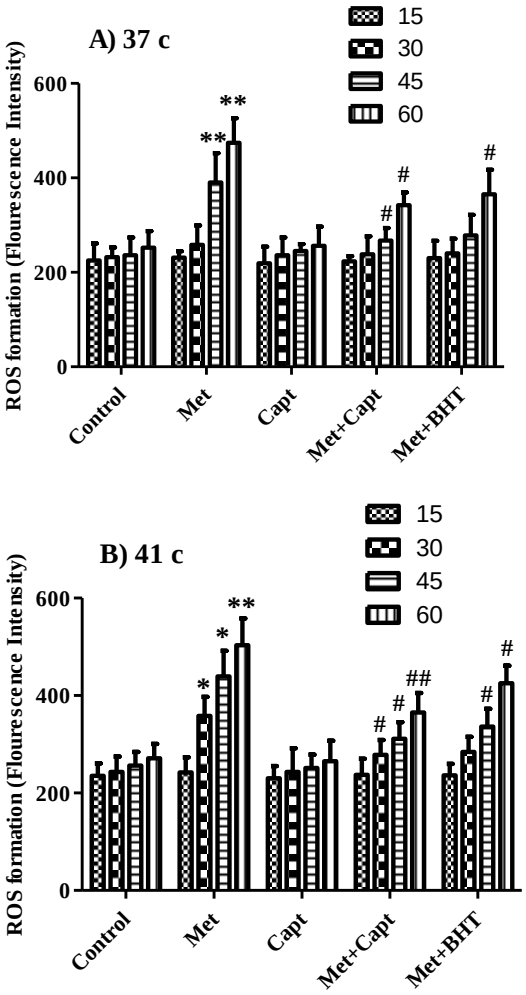
گلوتاتیون یکی از مهم‌ترین سیستم‌های دفاعی غیر آنزیمی در میتوکندری است که نقش مهمی را در خنثی کردن گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده در میتوکندری به عهده دارد. تماس با مت‌آمفتامین باعث کاهش در میزان گلوتاتیون احیا در میتوکندری‌های ایزوله از بافت قلب نسبت به گروه کنترل شد که این کاهش در گروه انکوبه شده در دمای ۴۱ درجه شدت بیش‌تری داشت. هم‌چنین با توجه به جداول، پیش تیمار با کاپتوپریل سبب افزایش در میزان گلوتاتیون احیا در میتوکندری‌های ایزوله از بافت قلب شد که اثرات بهتری را نسبت به مت‌آمفتامین به همراه BHT نشان داد (شکل ۴).



شکل ۴. تاثیر کاپتوپریل بر میزان گلوتاتیون در میتوکندری های در تماس با مت آمفتامین. غلظت گلوتاتیون بر حسب نانومولار گلوتاتیون حاصل از شش بار تکرار آزمایش به صورت میانگین و انحراف معیار بیان شده است. *: نشان دهنده ی اختلاف معنادار با گروه کنترل است (P<۰,۰۵). # : نشان دهنده ی اختلاف معنادار با گروه مت آمفتامین است(P<۰,۰۵).

در ادامه میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در میتوکندری‌های ایزوله از بافت قلب رت در تماس با مت‌آمفتامین به تنهایی و مت‌آمفتامین به همراه کاپتوپریل مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به شکل ۵، میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن توسط مت‌آمفتامین به صورت معناداری افزایش پیدا کرده است (P<۰/۰۵). در حالی که این میزان در گروه‌های دریافت‌کننده مت‌آمفتامین به همراه کاپتوپریل کاهش معناداری نشان داده است (P<۰/۰۵). از

طرفی افزایش درجه حرارت انکوباسیون سبب تشدید تولید رادیکال‌های آزاد ناشی از تماس با مت‌آمفتامین شد.



شکل ۵. تاثیر کاپتوپریل بر تولید ROS در میتوکندری های در تماس با مت آمفتامین (Met). میزان تولید ROS بر حسب شدت فلورسانس حاصل از شش بار تکرار آزمایش به صورت میانگین و انحراف معیار بیان شده است. *: نشان دهنده ی اختلاف معنادار با گروه کنترل است (P<۰,۰۵). **: نشان دهنده ی اختلاف معنادار با گروه کنترل است (P<۰,۰۱). # : نشان دهنده ی اختلاف معنادار با گروه مت آمفتامین است (P<۰,۰۵). ##: نشان دهنده ی اختلاف معنادار با گروه کنترل است (P<0.01).

تغییرات جذب سوسپانسیون میتوکندری را در ۵۴۰nm به منظور بررسی تورم میتوکندریایی ارزیابی شد که همان‌طور که در شکل ۶ نشان داده شده است، میزان تورم میتوکندریایی بعد از تماس با مت‌آمفتامین نسبت به گروه کنترل در میتوکندری‌های ایزوله شده از قلب افزایش معناداری پیدا کرده است (P<۰/۰۵). نتایج به دست آمده نشان داد که از کاپتوپریل توانست از بروز تورم میتوکندریایی ناشی از مت‌آمفتامین جلوگیری کند که اثر بهتری را نسبت به BHT نشان می‌دهد.

(محل شکل ۶)

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه ما نشان دادیم که مت‌آمفتامین با افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در میتوکندری‌های قلب، سبب افزایش میزان لیپیدپراکسیداسیون و کاهش گلوتاتیون احیا شده در نهایت منجر به باز شدن روزنه MPT شد که مرگ سلولی را به دنبال خواهند داشت. هم‌چنین افزایش درجه حرارت به ۴۱ درجه سبب تشدید آسیب ناشی از مت‌آمفتامین شد.

مطالعات مختلف نشان داده است که مت‌آمفتامین در طولانی‌مدت سبب نقص در سیستم دوپامینرژیک و سروتونرژیک می‌شود [۴]. هم‌چنین مطالعات اخیر نشان داده است که تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) یکی از عوامل آسیب‌رسان در مصرف آمفتامین‌ها به خصوص در تجویز دوزهای بالای آمفتامین و آنالوگ‌هایش است [۵،۶] و تجویز آنتی‌اکسیدانت‌ها سبب کاهش آسیب دوپامینرژیک ناشی از آمفتامین‌ها شده است [۷-۹].

مطالعه‌ی دیگری نشان داد که افزایش بیان خنثی‌کننده‌ی رادیکال‌های آزاد مانند سوپراکسید دیسموتاز سبب مهار آسیب نورونی ناشی از مت‌آمفتامین شد [۱۰]. مطالعات in vitro و in vivo هر دو نشان دادند که مت‌آمفتامین سبب افزایش آزادسازی دوپامین شده است و در نتیجه‌ی آن می‌تواند افزایش ROS (سوپراکساید (O_2^{-0}) و رادیکال‌های هیدروکسیل (OH^0)) توسط اتواکسیداسیون دوپامین آزاد سیتوزولی به وجود آید [۲۸].

نتایج ما نیز آسیب سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی در میتوکندری‌های ایزوله از قلب (توسط کاهش GSH) را در گروه مت‌آمفتامین اثبات کرد. این کاهش سیستم

آنتی‌اکسیدانتی می‌تواند نتیجه‌ی القای استرس اکسیداتیو توسط مت‌آمفتامین باشد که توسط افزایش در میزان ROS و پراکسیداسیون لیپیدی به اثبات رسید. به این صورت که مت‌آمفتامین با افزایش تولید رادیکال‌های آزاد سبب افزایش پراکسیداسیون لیپیدی در قلب شد. به این ترتیب افزایش پراکسیداسیون لیپیدی نیز سبب آسیب به غشا شده و تولید رادیکال‌های آزاد بیش‌تری را به دنبال دارد. تولید رادیکال‌های آزاد سبب اکسیداسیون گروه‌های تیول و کاهش گلوتاتیون احیا می‌شود که این امر سبب ایجاد تورم و سرانجام مرگ سلولی می‌شود. داده‌های ما مطالعات قبلی را تایید کردند [۳۰،۲۹] و نشان دادند که مت‌آمفتامین سبب کاهش GSH داخل سلولی، افزایش سطح MDA و تولید ROS داخل سلولی می‌شود.

استرس اکسیداتیو حالتی است که در اثر عدم توازن بین تولید رادیکال‌های آزاد و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی پیش می‌آید [۳۱]. امروزه به خوبی شناخته شده که استرس اکسیداتیو نقش مهمی در پاتوژنز بیماری‌های تحلیل رونده یا مزمن مانند پارکینسون، آلزایمر، آرترواسکلروز، دیابت و سرطان دارد و یکی از دلایل بروز ضایعات قلبی و عروقی است [۳۲،۲۱].

میتوکندری یکی از مهم‌ترین اندامک‌های داخل سلولی است که نقش مهمی را در تولید گونه‌های فعال اکسیژن و تولید ATP و فراهم آوردن انرژی مورد نیاز سلول دارد [۲۶]. علاوه بر این آسیب به میتوکندری و باز شدن روزنه‌های نفوذپذیری موقت (MPT)، سبب خروج فاکتورهای پروآپوپتوتیک از میتوکندری می‌شود که آغازکننده‌ی مرگ سلولی است [۳۳].

یکی از اثرات تولید رادیکال‌های آزاد در یک محیط بیولوژیک مثل سلول، حمله به اسیدهای چرب غیراشباع موجود در ساختمان غشا سلولی است که به عنوان پراکسیداسیون لیپیدی شناخته شده که به صورت زنجیروار باعث افزایش میزان رادیکال‌های آزاد شده و می‌تواند باعث پارگی غشای سلول، بروز نکروز و در نهایت فیبروز بافتی شود [۳۴].

روش MTT برای تعیین درصد عملکرد میتوکندری کاربرد فراوانی دارد [۳۵]. نتایج نشان داد که مت‌آمفتامین میزان از کار افتادگی بسیاری را در میتوکندری‌ها موجب شده است که این آسیب با افزایش درجه حرارت بیش‌تر شد.

آنتی‌اکسیدانت‌ها می‌توانند بدن انسان را در مقابل اثرات رادیکال‌های آزاد حفاظت کنند و پیشرفت بسیاری از بیماری‌های مزمن و پراکسیداسیون لیپیدها را به تأخیر بیندازند [۳۶]. آنتی‌اکسیدانت‌های متعددی با منشأ داخلی و خارجی وجود دارند که اجزای سلول را در برابر رادیکال‌های آزاد محافظت می‌نمایند. مهم‌ترین اجزاء سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی درون سلولی شامل آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) و کاتالاز (CAT) می‌باشند. هم‌چنین گلوتاتیون و بتاکاروتن نیز جزء این سیستم دفاعی درون سلولی هستند. از مواد تشکیل‌دهنده سیستم دفاع خارج سلولی می‌توان ویتامین C، اسید اوریک، بیلی‌روبین و گروه‌های سولفیدریل را نام برد [۳۶].

مطالعات قبلی نشان دادند که مهارکننده‌های آنزیم مبدل آنژیوتانسین به خصوص کاپتوپریل باعث مهار استرس اکسیداتیو می‌شوند [۳۷]. این اثرات آن‌ها مستقل از توانایی آن‌ها در کاهش فشار خون است [۱۹]. این اثرات کاپتوپریل به احتمالاً به خاطر گروه‌های گوگردی است که در ساختار آن‌ها وجود دارد و باعث خنثی شدن رادیکال‌های آزاد می‌شود. در واقع این گروه‌های تیول مانند برخی آنتی‌اکسیدانت‌های شناخته شده بدن مثل گلوتاتیون می‌توانند با دادن الکترون به رادیکال‌های آزاد سبب خنثی شدن آن‌ها شده و از ادامه فرآیند آسیب اکسیداتیو مثل حمله به ماکرومولکول‌های سلولی مانند لیپیدها، پروتئین و یا DNA جلوگیری کند [۳۸]. در مطالعه‌ای اثرات محافظتی کاپتوپریل در جلوگیری از سمیت دوکسوروبیسین در میتوکندری‌های ایزوله از کبد رت مورد بررسی قرار گرفت که باعث مهار قابل توجه لیپیدپراکسیداسیون و اکسیداسیون گلوتاتیون و افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در میتوکندری‌های ایزوله از کبد رت شد [۳۹]. در مطالعه‌ی دیگر در سال ۲۰۰۶ اثرات

محافظتی کاپتوپریل در جلوگیری از سمیت پاراکوات در سلول‌های کبد رت مورد بررسی قرار گرفت که باعث مهار قابل توجه لیپیدپراکسیداسیون و اکسیداسیون گلوتاتیون در سلول‌های کبد رت شد [۴۰].

مطالعات قبلی نشان دادند که استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌ها در کاهش سمیت مت‌آمفتامین مؤثر بوده است. بنابراین با توجه به اثرات آنتی‌اکسیدانتی کاپتوپریل، ما از این ماده برای افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی، محافظت در برابر استرس اکسیداتیو و متعاقباً آسیب میتوکندری‌های قلبی ناشی از مت‌آمفتامین استفاده کردیم. نتایج مطالعه‌ی ما نشان دادند که کاپتوپریل به صورت معناداری سبب کاهش ROS و پراکسیداسیون لیپیدی در میتوکندری‌های ایزوله از قلب شد و به این ترتیب آسیب به میتوکندری کاهش یافت. این داده‌ها گزارشات قبلی در مورد توانایی کاپتوپریل را در کاهش پراکسیداسیون لیپیدی را تایید کردند [۴۰].

نتایج ما هم‌چنین نشان دادند که کاپتوپریل، تورم میتوکندری را به عنوان شاخص باز شدن منافذ MPT، شدیداً مهار می‌کند که می‌تواند در نهایت شروع فرآیند مرگ سلولی و در نتیجه سمیت بافتی را مهار کند. از طرفی گلوتاتیون یک تری‌پپتید است و یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدانت‌ها و هم‌چنین کوفاکتور در متابولیسم بسیاری از مواد مختلف محسوب می‌شود. تقریباً ۱۵-۱۰٪ از گلوتاتیون احیای داخل سلولی در میتوکندری قرار دارد [۴۱]. گلوتاتیون در میتوکندری دو نقش مهم را ایفا می‌کند. از طرفی به عنوان یکی از مهم‌ترین دفاع‌های آنتی‌اکسیدانتی غیر آنزیمی در میتوکندری عمل کرده و با گونه‌های فعال اکسیژن واکنش داده و به GSSG اکسید می‌شود. از طرف دیگر، گلوتاتیون برای حفظ حالت احیای گروه‌های سولفیدریل پروتئین‌هایی که در غشای داخلی میتوکندری قرار دارند لازم و ضروری است. در صورت اکسیداسیون ذخایر گلوتاتیون میتوکندری، گروه‌های سولفیدریل پروتئین‌هایی که در غشای داخلی میتوکندری قرار دارند دچار اکسیداسیون شده و به صورت گروه‌های S-S در می‌آیند که این اتصال متقاطع گروه‌های سولفیدریل منجر به تغییرات فضایی در ساختار میتوکندری و باز شدن منافذ PT و بروز پدیده‌ی MPT و در نهایت خروج سیتوکروم C از میتوکندری می‌شود [۴۲]. بنابراین بخشی از اثرات کاهش سمیت قلبی کاپتوپریل می‌تواند ناشی از جلوگیری از اکسید شدن گروه‌های تیول و مهار فرآیند آپوپتوز باشد.

بنابراین کاپتوپریل، با ویژگی آنتی‌اکسیدانتی خود و خاصیت جاروب‌کنندگی رادیکال‌های آزاد، به نظر می‌رسد که می‌تواند یک عامل خوبی در محافظت آسیب اکسیداتیو ناشی از مت‌آمفتامین باشد.

نتایج مطالعه‌ی ما آسیب اکسیداتیو به میتوکندری‌های قلب را در تماس با مت‌آمفتامین تأیید کرد. هم‌چنین داده‌های ما به خوبی اثربخشی کاپتوپریل را در کاهش تولید رادیکال‌های آزاد ناشی از مت‌آمفتامین در میتوکندری‌های ایزوله از قلب و پیامدهایی مثل لیپیدپراکسیداسیون، اکسیداسیون گلوتاتیون و از کار افتادن میتوکندری نشان داد. بنابراین می‌توان پیشنهاد کرد از کاپتوپریل در درمان موقعیت‌های پاتولوژیک مشابه که ناشی از استرس اکسیداتیو و آسیب میتوکندری نقش دارند می‌توان استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه آقای جواد ملاحسنی دانشجوی داروسازی ساری است. بودجه این طرح توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران تامین شد.

منابع

[1] Pourahmad J, Eskandari MR, Nosrati M, Kobarfard F, Khajeamiri AR. Involvement of mitochondrial/lysosomal toxic cross-talk in ecstasy induced liver toxicity under hyperthermic condition. Eur J Pharmacol 2010; 643: 162-169.

[2] Piper BJ. A developmental comparison of the neurobehavioral effects of ecstasy (MDMA). Neurotoxicol Teratol 2007; 29: 288-300.

[3] Brown JM, Yamamoto BK. Effects of amphetamines on mitochondrial function: role of free radicals and oxidative stress. Pharmacol Ther 2003; 99: 45-53.

[4] Ricaurte GA, Seiden L, Schuster CR. Further evidence that amphetamines produce long-lasting dopamine neurochemical deficits by destroying dopamine nerve fibers. Brain Res 1984; 303: 359-364.

[5] Fleckenstein AE, Wilkins DG, Gibb JW, Hanson GR. Interaction between hyperthermia and oxygen radical formation in the 5-hydroxytryptaminergic response to a single methamphetamine administration. J Pharmacol Exp Ther 1997; 283: 281-285.

[6] Yamamoto BK, Zhu W. The effects of methamphetamine on the production of free radicals and oxidative stress. J Pharmacol Exp Ther 1998; 287: 107-114.

[7] Wagner G, Carelli R, Jarvis M. Pretreatment with ascorbic acid attenuates the neurotoxic effects of methamphetamine in rats. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 1985; 47: 221-228.

[8] De Vito MJ, Wagner G. Methamphetamine-induced neuronal damage: a possible role for free radicals. Neuropharmacology 1989; 28: 1145-1150.

[9] Hirata H, Ladenheim B, Carlson E, Epstein C, Cadet JL. Autoradiographic evidence for methamphetamine-induced striatal dopaminergic loss in mouse brain: attenuation in CuZn-superoxide dismutase transgenic mice. Brain Res 1996; 714: 95-103.

[10] Chan P, Monte DA, Luo JJ, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW. Rapid ATP loss caused by methamphetamine in the mouse striatum: relationship between energy impairment and dopaminergic neurotoxicity. J Neurochem 1994; 62: 2484-2487.

[11] GRAHAM DG. Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. Mol Pharmacol 1978; 14: 633-643.

[12] Bowyer JF, Davies DL, Schmued L, Broening HW, Newport GD, Slikker W, Holson RR. Further studies of the role of hyperthermia in methamphetamine neurotoxicity. J Pharmacol Exp Ther 1994; 268: 1571-1580.

[13] Skonieczna M, Kruszewska J, Nowak J, Bicz W. Influence of increased environmental temperature on oxidation processes in rat liver mitochondria. Acta Physiol Pol 1985; 37: 157-167.

[14] Lepock JR, Cheng K-H, Al-qysi H, Sim I, Koch CJ, Kruuv J. Hyperthermia-induced inhibition of respiration and mitochondrial protein denaturation in CHL cells. Int J Hyperthermia 1987; 3: 123-132.

[15] Madl J, Allen D. Hyperthermia depletes adenosine triphosphate and decreases glutamate uptake in rat hippocampal slices. Neuroscience 1995; 69: 395-405.

[16] Volti G, Murabito P, Attaguile G, Rodella L, Astuto M, Di Giacomo C, Gullo A. Antioxidant properties of propofol when oxidative stress sleeps with patients. Excli J 2006; 5: 25-32.

[17] Kazerani H, Haji MB. Effects of sublingual captopril in immediate treatment of hypertensive crisis. Hamedan Sci J. 2007; 14: 1-5

[18] De Cavanagh E, Fraga C, Ferder L, Inserra F. Enalapril and captopril enhance antioxidant defenses in mouse tissues. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 1997; 272: R514-R518.

[19] Ghazi-Khansari M, Mohammadi-Bardbori A, Hosseini MJ. Using janus green B to study paraquat toxicity in rat liver mitochondria. Ann N Y Acad Sci 2006; 1090: 98-107.

[20] Mohammadi-Bardbori A, Ghazi-Khansari M. The inhibitory effect of captopril on paraquat toxicity in mitochondria isolated from the rat liver. J Kerman Univ Med Sci 2006; 13: 132-140. (Persian).

[21] Mattson MP. Mechanisms of neuronal apoptosis and excitotoxicity. Pathogenesis of neurodegenerative disorders: Springer 2001; p: 1-20.

[22] Shaki F, Hosseini MJ, Ghazi-Khansari M, Pourahmad J. Toxicity of depleted uranium on isolated rat kidney mitochondria. Biochim Biophys Acta 2012; 1820: 1940-1950.

[23] SHokzadeh M, Alidoust F, Nourian Y, Vaezi N, Mohammadi E, SHaki F. Paper: Protective effects of resveratrol against paraquat-induced mitochondrial dysfunction in brain and lung isolated mitochondria. (Persian).

[24] Zhang F, Xu Z, Gao J, Xu B, Deng Y. In vitro effect of manganese chloride exposure on energy metabolism and oxidative damage of mitochondria isolated from rat brain. Environ Toxicol Pharmacol 2008; 26: 232-236.

[25] Sadegh C, Schreck RP. The spectroscopic determination of aqueous sulfite using Ellman's reagent. MURJ 2003; 8: 39-43.

[26] Hosseini M-J, Shaki F, Ghazi-Khansari M, Pourahmad J. Toxicity of arsenic (III) on isolated liver mitochondria: a new mechanistic approach. Iran J Pharm Res 2013; 12: 121. (Persian).

[27] Zhao Y, Ye L, Liu H, Xia Q, Zhang Y, Yang X, Wang K. Vanadium compounds induced mitochondria permeability transition pore (PTP) opening related to oxidative stress. J Inorg Biochem 2010; 104: 371-378.

[28] Miyazaki I. Dopaminergic neuron-specific oxidative stress caused by dopamine itself: Okayama University; 1999.

[29] Zhang X, Banerjee A, Banks WA, Ercal N. N-Acetylcysteine amide protects against methamphetamine-induced oxidative stress and neurotoxicity in immortalized human brain endothelial cells. Brain Res 2009; 1275: 87-95.

[30] Lee YW, Hennig B, Yao J, Toborek M. Methamphetamine induces AP-1 and NF-κB binding and transactivation in human brain endothelial cells. J Neurosci Res 2001; 66: 583-591.

[31] Halliwell B, Gutteridge J. Free radicals in biology and medicine. NY: Oxford University Press–1999–968 p 2011.

[32] Young TA, Cunningham CC, Bailey SM. Reactive oxygen species production by the mitochondrial respiratory chain in isolated rat hepatocytes and liver mitochondria: studies using myxothiazol. Arch Biochem Biophys 2002; 405: 65-72.

[33] Hosseini MJ, Shaki F, Ghazi-Khansari M, Pourahmad J. Toxicity of vanadium on isolated rat liver mitochondria: a new mechanistic approach. Metallomics 2013; 5: 152-166.

[34] Stadtman ER, Levine RL. Protein oxidation. Ann N Y Acad Sci 2000; 899: 191-208.

[35] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983; 65: 55-63.

[36] Fiala M, Liu Q, Sayre J, Pop V, Brahmandam V, Graves M, Vinters H. Cyclooxygenase-2-positive macrophages infiltrate the Alzheimer's disease brain and damage the blood–brain barrier. Eur J Clin Invest 2002; 32: 360-371.

[37] Parving H-H, Lehnert H, Bröchner-Mortensen J, Gomis R, Andersen S, Arner P. The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. N E J Med 2001; 345: 870-878.

[38] Dineley KE, Richards LL, Votyakova TV, Reynolds IJ. Zinc causes loss of membrane potential and elevates reactive oxygen species in rat brain mitochondria. Mitochondrion 2005; 5: 55-65.

[39] Ghazi-Khansari M, Mohammadi-bardbori A. Captopril ameliorated mitochondrial toxicity due to paraquat. Toxicol In Vitro 2006; 21: 403-407.

[40] Patel SP, Katyare SS. Effect of alloxan-diabetes and subsequent treatment with insulin on lipid/phospholipid composition of rat brain microsomes and mitochondria. Neurosci Lett 2006; 399: 129-134.

[41] Zhong Q, Putt DA, Xu F, Lash LH. Hepatic mitochondrial transport of glutathione: studies in isolated rat liver mitochondria and H4IIE rat hepatoma cells. Arch Biochem Biophys 2008; 474: 119-127.

[42] Kowaltowski AJ, Netto LE, Vercesi AE. The Thiol-specific antioxidant enzyme prevents mitochondrial permeability transition evidence for the participation of reactive oxygen species in this mechanism. J Biol Chem 1998; 273: 12766-12769.

Captopril inhibited metamphetamine - induced cardiac mitochondrial damage in hyperthermic condition via modulation of biochemical markers

Mohammd Shokrzadeh (Ph.D)[1,2], Ehsan Zamani (Pharm.D)[1,2], Javad Mollahasani (Pharm.D)[1,2], Fatemeh Shaki (Ph.D)[*1,2]

1 - Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

2 – Dept. of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received: 5 Jan 2016; Accepted: 30 Apr 2016)

Introduction*:* Methamphetamine (METH) is a known abused drug which could induce cardiotoxicity. Captopril is an angiotensin converting enzyme inhibitor that is used in hypertension therapy and has known antioxidant effects. In this study we evaluated the effect of captopril against METH-induced toxicity in rat heart isolated mitochondria in hyperthermic condition.

Materials and Methods*:* Mitochondrial fractions were isolated from heart of Wistar rat with different centrifuge technique. Then, heart isolated mitochondrial were exposed to METH (LC50, 250µM) and captopril (0, 25, 50, 100, 200, 400 µM) and incubated at 37 and 41 C. After 1 h incubation, mitochondrial damage was assayed by MTT test. Also, oxidative stress markers were measured.

Results*:* Our results showed that METH significantly induced mitochondrial damage that was more pronounced in hyperthermic condition. Increased oxidative stress markers such as lipid peroxidation, reactive oxygen species formation and glutathione oxidation in the heart isolated mitochondria were observed after METH exposure that was more significant at 41 c than 37 C. Captopril significantly inhibited METH–induced oxidative stress in the heart isolated mitochondria. Also, captopril pretreatment significantly improved mitochondrial function. Mitochondrial swelling also increased after METH exposure, but was significantly decreased with captopril pre-treatment.

Conclusion*:* These results suggested that captopril could ameliorate METH-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction especially in hyperthermic condition. Therefore, the effectiveness of this antioxidant should be evaluated for the treatment of METH cardiotoxicity.

Keywords: Captopril, Methamphetamine, Cardiotoxicity, Mitochondria; Oxidative Stress, Rat

* Corresponding author. Tel: +98 9112559051

fshaki.tox@gmail.com