طب‌نظامی
زمستان ۱۳۸٤، شماره ۷ (٤)
صفحات: ۲۷۷ -۲۷۱

بررسی اثر محافظتی هگزامتیلن تترامین بر رده سلولی HF2FF تحت تاثیر سولفورموستارد

مهدی صابری[۱]*.Ph.D.، علی‌بمان زارعی[۲]**.Ph.D.، ژیلا پیرزاد[۳]*.M.Sc.، لیلا گل‌منش[۴]**.M.Sc.،
حسین ایمانی[۵]***.Ph.D.، غلامرضا پورحیدری‌زاده[۶]* .Ph.D و مهوش جعفری[۷]**.Ph.D.

آدرس مکاتبه: دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... «عج» – دانشکده پزشکی- گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی و مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی- تهران- ایران*

** دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... «عج»- دانشکده پزشکی- گروه بیوشیمی و مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی- تهران- ایران

*** دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... «عج» – دانشکده پزشکی- گروه آناتومی- تهران- ایران

تاریخ اعلام وصول: ۱۳۸٤/۹/۲۲ تاریخ دریافت مقاله اصلاح شده:۱۳۸۵/۲/۷ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۱۳۸۵/۳/۱۱

خلاصه

مقدمه: سولفورموستارد (HD)، به‌عنوان یک سلاح شیمیایی بسیار خطرناک همیشه مورد استفاده بوده است. علیرغم تحقیقات گسترده طی چندین دهه هنوز راه‌کار مناسبی برای پیشگیری یا درمان عوارض HD یافت نشده است.

مواد و روش کار: در این مطالعه ردهٔ سلولی HF2FF به‌عنوان مدلی از سلول‌های فیبروبلاست پوست انسان برای بررسی اثرات سمی HD و اثر محافظتی هگزامتیلن تترامین (HMT) در مقابل HD مورد استفاده قرار گرفت. روش‌های رنگ‌آمیزی ویوله‌ژانسیان (Gentiana violet =GV) و قرمز خنثی (Neutral Rd= NR) برای تعیین میزان سلول‌های زنده (Viability) به‌عنوان معیار مهم ارزیابی به‌کار گرفته شدند. توانایی اثر محافظتی HMT در پیش‌گیری از اثر خردل (Lethal concentration$_{50}$= LC)، در حالات مختلف تعیین گردید.

نتایج: استفاده از غلظت‌های مختلف HD نشان داد، با افزایش غلظت به بیش از ۳۰ میکرومولار اثرات سمی به‌سرعت در سلول ایجاد شده و میزان سلول‌های زنده، با افزایش غلظت HD به‌شدت کاهش می‌یابد. غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار HD سبب کاهش سلول‌های زنده به میزان۷۰ درصد پس از ۵ دقیقه و ۸۰ درصد کاهش پس از یک‌ساعت گردید (کنترل۱۰۰درصد). در حالی که غلظت ۳۰ میکرومولار HD حتی پس از یک‌ساعت در میزان سلول‌های زنده فقط ۱۸ درصد کاهش ایجاد نمود. با استفاده از منحنی دوز- جواب، غلظت مناسب HD در محیط کشت برای ایجاد ۵۰ درصد مرگ سلولی (LC50) میزان ۱۸۰ میکرومولار طی ۱۵ دقیقه تعیین گردید.

HMT با غلظت ۱۰ میکرومولار به‌تنهایی بر میزان سلول‌های زنده اثر معنی‌داری نداشت. پیش‌دریافت HMT قبل از HD در محیط کشت به‌طور معنی‌داری تا ۳۶ درصد مرگ سلولی ناشی از خردل را کاهش داد، لیکن با مصرف همزمان HMT و HD کاهش مرگ سلولی به‌ترتیب با متدهای GV و NR ۲۳ درصد و ۲۸/۵ درصد بوده است. مصرف HMT پس از آلودگی با HD اثر برجسته‌ای در پیش‌گیری از مرگ و میر سلولی نداشت.

---

۱ ـ استادیار ـ دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج»
۲ ـ استادیار ـ دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج»
۳ ـ کارشناس ارشد ـ دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج»
۴ ـ کارشناس ارشد ـ دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج»
۵ ـ استادیار ـ دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج»
۶ ـ دانشیار ـ دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج»
۷ ـ استادیار ـ دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...«عج»

بحث: نتایج فوق نشان می‌دهد کهHMT می‌تواند سلول‌های فوق را در مقابل اثرات سمی HD محافظت نماید. هر چند HMT باید در زمان آلودگی با HD موجود باشد. مصرف HMT پس از تماس خردل با سلول‌ها تاثیری در پیشگیری از مرگ و میر سلولی نخواهد داشت. مطالعات درون تنی (In-vivo) برای تعیین اثربخشی و کارآیی HMT در پیش‌گیری از سمیت ناشی از خردل پیشنهاد می‌گردد. مطالعه فوق نشان داد سلول‌های HF2FF مدل آزمایشگاهی ارزشمندی برای مطالعه سمیت HD و دیگر مواد آسیب رساننده به پوست و نیز بررسی سایر ترکیبات دارای کارآیی بالقوه درمانی قبل از آزمایشات درون تنی می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: سولفور موستارد، سلول‌های HF2FF، هگزامتیلن تترامین (HMT)

مقدمه

بیس-(۲-کلرواتیل)-سولفید که عموماً سولفورموستارد و یا گاز موستارد نامیده می‌شود، در جنگ جهانی اول و نیز اخیراً بارها توسط عراق علیه ایران و نیز مواضع کردهای عراقی به‌کار رفت [۱و۲]. این ماده یک آلکیله‌کننده بسیار قوی بوده که در اثر تماس با پوست انسان ایجاد تاول‌های شدیدی می‌نماید [۱]. ایجاد تاول ممکن است بخشی به دلیل آزادشدن پروتئازها باشد که سبب صدمه به گلیکوپروتئین‌هایی نظیر لامینین (واسطه اتصال درم و اپیدرم) می‌گردد [۲].

HD با گروه‌های نوکلئوفیل در سلول، به‌ویژه DNA به‌طور برگشت‌ناپذیر اتصال کوالان می‌یابد. این اتصال در بین رشته‌ها و نیز در سراسر یک رشته ممکن است ایجاد گردد که سبب مهار میتوز، تحلیل میزان +NAD، مهار گلیکولیز و نهایتاً مرگ سلولی می‌گردد. مرگ سلولی ممکن است مستقیماً از واکنش HD با آنزیم‌های مختلف از جمله سیستم پیرووات اکسیداز ایجاد گردد [۲].

پیش‌درمانی و محافظت بعضی از ارگان‌ها از جمله پوست و سیستم تنفسی با نوکلئوفیل‌ها ممکن است عوارض ناشی از تماس با خردل را تا حدودی مرتفع نماید. در این زمینه موفقیت‌هایی با استرهای سیستئین و گلوتاتیون اتیل استر حاصل شده است [۳، ۴]. ترکیبات دارای گروه‌های تیول مانند گلوتاتیون و مشتقات آن نظیر گاما-گلوتامیل سیستئین سبب محافظت کراتینوسیت‌های پوست انسان در مقابل HD شده‌اند [۲، ۵ و ۶]. استرهای سیستئین نیز برش‌های سلول‌های ریوی موش‌های صحرایی را در مقابل HD محافظت نموده است [۷].

به‌علاوه اثرات سمی HD بر لنفوسیت‌های خون محیطی انسان توسط گلوتاتیون اتیل استر کاهش یافته و N- استیل سیستئین (NAC) در In-vitro سلول‌های فوق را در مقابل اثرات سمی HD بر سلول محافظت نموده است [۷ و ۸]. ترکیبات فوق عمدتاً با تقویت و افزایش میزان گلوتاتیون داخل سلولی سبب افزایش توان مقابله سلول با HD شده و خود مستقیماً نوکلئوفیل نیستند. از طرفی هگزامتیلن تترامین ماده‌ای نوکلئوفیل با کارآیی زیاد بوده که مصرف آن همزمان با HD در محیط کشت سلول‌های ریوی اثر محافظتی نشان داده است [۳]. اثر محافظتی این ماده در مقابل دوزهای کشنده فسژن در انسان و حیوانات به اثبات رسیده است [۹]. با توجه به نقش پوست در محافظت از بدن و آلودگی سریع آن در مواجهه با مواد و سموم، آسیب‌پذیری آن به‌ویژه در تماس با HD بسیار شدید و وسیع می‌باشد. در این مطالعه اثر محافظتی HMT در محیط کشت سلول‌های فیبروبلاست پوست انسان و در مواجهه با HD بررسی گردید. با توجه به عدم امکان استفاده از مدل‌های زنده انسان و نیز مشکلات کشت بافت پوست و عدم دقت کافی در تهیه برش و نمونه‌های پوست به‌منظور تسهیل در ارزیابی HMT به‌عنوان یک نوکلئوفیل محافظ در مقابل HD یک مدل In-vitro از سلول‌های HF2FF نوع فیبروبلاست پوست انسان تهیه و مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روش کار

رده سلولی (HF2FF(NO.NCBI-C190 از انستیتو پاستور ایران، محیط کشت HBSS، M199 و RPMI از شرکت: ICN , Biomedical Inc.; FBS از شرکت Biochrom AM آلمان، HMT از شرکت Sigma، HD از سازمان صنایع دفاع، تریپسین، لوله‌های فالکون و فیلتر سرسرنگی و سایر مواد مورد نیاز از کمپانی‌های مرک آلمان و بیوژن تهیه گردیدند.

نحوهٔ کشت سلولی: ردهٔ سلولی HF2FF در محیط کشت RPMI که شامل ۱۰ درصد FCS، پنی‌سیلین و استرپتومایسین هرکدام ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر و بیکربنات سدیم به میزان ۲ گرم بر لیتر است، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO2، ۹۵ درصد هوای مرطوب، در فلاکس‌های ۵۰ml کشت داده شدند.

این سلول‌ها پس از رشد در فاز لگاریتمی با تریپسین جدا شده و در ۸۰- درجه سانتی‌گراد و DMSO ذخیره یا در آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. سلول‌های جداشده از محیط کشت در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای با تراکم 5×10^4 سلول در هر حفره با محیط M199 قرار گرفته و به مدت ۲۴ ساعت (قبل از آزمایش) برای چسبیدن سلول در همین حال باقی می‌مانند. HD در غلظت‌های مختلف ۳۰، ۱۰۰، ۱۸۰، ۳۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار در HBSS بلافاصله قبل از مصرف با استفاده از محلول استوک HD حاوی ۴۰ میلی‌مولار HD در پروپان دی‌اول تهیه گردید. محیط کشت بی‌رنگ M199 هنگام استفاده از رنگ NR برای پیش‌گیری از تداخل احتمالی ناشی از حضور فنل قرمز موجود در RPMI، مورد استفاده قرار گرفت. NR در لیزوزوم‌های سلول‌های زنده تجمع می‌یابد. متد سنجش فوق در این تحقیق به‌عنوان معیار اندازه‌گیری سلول‌های زنده مورد استفاده قرار گرفت [۱۰]. همچنین با استفاده از رنگ GV دانسیتهٔ سلول‌ها در محیط‌های حاوی سلول‌های تحت آزمایش اندازه‌گیری و نیز به‌عنوان معیاری اضافه بر NR برای تعیین میزان سلول‌های زنده به‌کار گرفته شد [۱۱].

اثر غلظت‌های مختلف HD بر سلول‌های HF2FF: محیط کشت RPMI موجود در مجاورت سلول‌ها در پلیت ۹۶ حفره‌ای خالی و با ۲۰۰ میکرولیتر از محلول HBSS حاوی رقت‌های مختلف خردل (۳۰، ۱۰۰، ۱۸۰، ۳۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار) جایگزین گردید. سلول‌ها به مدت ۵ تا ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در معرض غلظت‌های مختلف خردل قرار گرفتند. سپس محیط حاوی HD تخلیه و ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت M199 به هر حفره اضافه گردید. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در شرایط گفته شده در بالا قرار گرفته، سپس متدهای GV و NR برای تعیین میزان سلول‌های زنده به‌کار گرفته شدند (n=۲۴). با استفاده از منحنی دوز- جواب، غلظت کشنده ۵۰ درصد (LC_{50})، تعیین گردید.

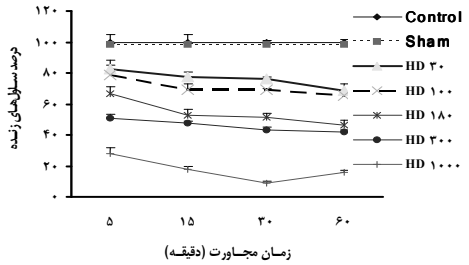
بررسی اثر محافظتی HMT بر سلول‌های HF2FF در معرض خردل: توانایی HMT در مقابله با اثرات HD برای محافظت سلول‌ها در مقابل LC_{50} از HD با افزودن محلول ۳۰ میلی‌مولار HMT + HBSS به میزان ۱۰۰میکرولیتر در پلیت‌های حاوی ۹۶ حفره (۲۶ حفره برای هر گروه) و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول HBSS + HD قبل، همزمان یا بعد از افزودن HMT انجام شد.

محیط‌های کشت به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد (۵ درصد ازCO2 و ۹۵ درصد هوا) انکوبه شده، سپس با ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت M199 جایگزین و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط فوق قرار گرفته، میزان سلول‌های زنده پس از زمان فوق با روش‌های GV و NR تعیین گردیدند. لذا سلول‌های HF2FF با HBSS به تنهایی، HBSS+HMT ، HBSS+HD ، HD+HBSS+HMT به‌صورت همزمان، قبل و بعد (۲۴ حفره برای هر گروه) مجاور گردیدند. غلظت نهایی HMT به تنهایی ۱۰ و یا ۱۵ میکرومولار و برای مجاورت با HD، غلظت نهایی ۱۵میکرومولار تنظیم گردید. با توجه به گزارش‌های قبلی که نشان داده‌اند حتی غلظت‌های زیاد خردل (۱۰۰۰میکرومولار) پس از ۲۰ساعت اثر کاهنده بیشتری بر میزان سلول‌های زنده ندارد [۳]، حداکثر زمان در این آزمایش‌ها ۲۴ ساعت انتخاب گردید.

روش‌های آماری ANOVA و U-test، Mann-Whitney برای دوزهای مختلف HD و آزمون Students t-Test دوطرفه (unpaired) برای تعیین اثر محافظتی معنی‌دار HMT در کاربرد به‌صورت قبل، همزمان یا بعد ازHD در مقایسه با HD به تنهایی به‌کار گرفته شد.

نتایج

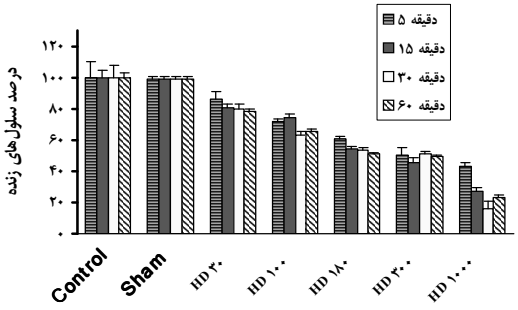
اثر دوزهای مختلف HD بر سلول‌های HF2FF: بیشترین اثر مخرب خردل بر سلول‌های HF2FF در دوزهای بالاتر از ۳۰ میکرومولار مشاهده گردید. با افزایش غلظت HD اثر تخریبی به شدت افزایش یافت. HD باغلظت ۱۸۰ میکرومولار پس از ۱۵ دقیقه و با غلظت ۳۰۰ میکرومولار پس از ۵ دقیقه باعث مرگ تقریباً ۵۰ درصد از سلول‌ها شده است (LC_{50}). لذا غلظت ۱۸۰ میکرومولار HD به مدت ۱۵ دقیقه به‌عنوان دوز مناسب (LC_{50}) جهت آزمایش‌های بعدی در نظر گرفته شد (شکل ۱).



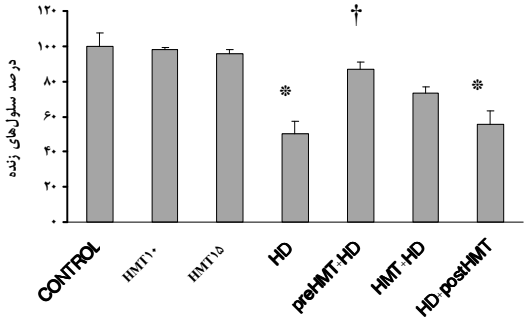
شکل ۱: اثر غلظت‌های مختلف سولفور موستارد (HD) بر میزان سلول‌های زنده تعیین شده با استفاده از رنگ‌آمیزی ویوله ژانسیان(GV) در زمان‌های مختلف. داده‌ها برحسب درصد کنترل بیان شده‌اند. تعداد نمونه در هر گروه حداقل ۲۴ عدد می‌باشد.

اثر غلظت‌های مختلف HD پس از ۱۵ دقیقه بر سلول‌ها نسبتاً کامل شده و پس از آن تغییر معنی‌داری در سلول‌های زنده مشاهده نمی‌گردید. هرچند کاهش جزیی در سلول‌های زنده تا ۱ ساعت وجود داشته است (شکل۲).

به‌عنوان مثال غلظت ۱۸۰ میکرومولار HD پس از ۵ دقیقه میزان سلول‌های زنده را به۶۹/۹۴ درصد (سنجش با GV) و ۶۲/۳۶ درصد (NR) کاهش داده در حالی که با غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار به ۲۷/۸۲ درصد (GV) و ۴۲/۷۱درصد (NR) کاهش یافته‌اند. لیکن با غلظت۱۸۰ میکرومولار میزان سلول‌های زنده پس از ۱۵ دقیقه به ۵۵ درصد (GV) و با غلظت ۱۰۰۰ به ۱۷/۸۵درصد (GV) کاهش یافته‌اند. روش‌های GV و NR با تعیین تعداد سلول‌های زنده بروز اثر سریع HD را در غلظت‌های زیاد اثبات نمودند و پس از ۵ دقیقه با دوز بالا (۱۰۰۰میکرومولار) بیش از ۷۰ –۶۰ درصد سلول‌ها از بین رفتند.



شکل ۲: اثر غلظت‌های مختلف سولفور موستارد (HD) بر میزان سلول‌های زنده تعیین شده با استفاده از رنگ‌آمیزی قرمز خنثی (NR) در زمان‌های مختلف. داده‌ها برحسب درصد کنترل بیان شده‌اند. تعداد نمونه در هر گروه حداقل ۲۴ عدد می‌باشد. غلظت‌های محتلف HD در زمان‌های مختلف به‌طور بسیار معنی‌داری میزان سلول‌های زنده را کاهش داده است.

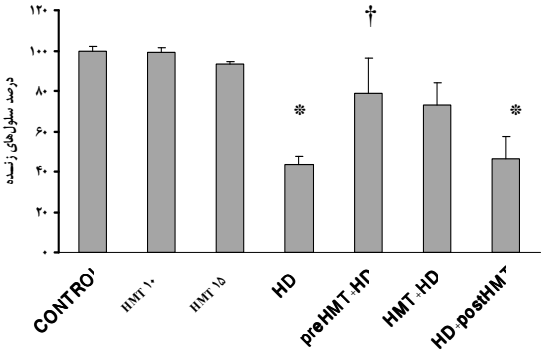


شکل ۳: اثر محافظتی هگزامتیلن‌تترامین (HMT) در پیشگیری از مرگ سلولی ناشی از سولفور موستارد (HD). میزان سلول‌های زنده با استفاده از رنگ آمیزی ویوله ژانسیان(GV) تعیین شده‌اند. HMT به تنهایی، قبل (PreHMT+HD)، همزمان (HMT+HD) یا بعد از HD (HD+postHMT) به‌کار رفته است. * نسبت به گروه کنترل و † نسبت به HD معنی دار است. داده‌ها برحسب درصد کنترل بیان شده‌اند. تعداد نمونه در هر گروه حداقل ۲۴ عدد می‌باشد، P<۰/۰۰۱.

اثر محافظتی HMT در مقابل اثرات HD بر سلول‌های HF2FF: HMT به تنهایی در غلظت‌های ۱۰ و ۱۵ میلی مولار هیچ‌گونه اثر معنی‌داری بر میزان سلول‌های زنده نداشت. سلول‌های HF2FF ابتدا HMT را با غلظت نهایی ۱۵ میلی‌مولار دریافت نموده و سپس در معرض خردل قرار گرفتند. با استفاده از روش GV مشخص گردید میزان سلول‌های زنده از ۴۳/۲ درصد (در حضورHD) به ۷۸/۶ درصد (HMT+HD) افزایش می‌یابند

(شکل ۳). با روش اندازه‌گیری NR میزان سلول‌های زنده از ۵۰/۳ (در حضور HD به تنهایی) تا ۸۶/۶ (HMT+HD) افزایش نشان داده که از نظر آماری معنی‌دار ($p < ۰/۰۰۱$) می‌باشد.

مصرف همزمان HD و HMT در محیط کشت سلول‌های HF2FF نشان داد HMT می‌تواند در مقایسه با HD به تنهایی میزان سلول‌های زنده را ۲۳ درصد و ۲۹درصد به‌ترتیب با روش سنجش NR و GV افزایش دهد ($p < ۰/۰۰۱$) (شکل‌های ۳ و۴). مصرف HMT پس از افزودن HD هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری در افزایش میزان سلول‌های زنده ایجاد ننمود و تنها حدود ۵ درصد افزایش در میزان سلول‌های زنده مشاهده گردید. مطالعات میکروسکوپی نشان داد، سلول‌ها پس از آلودگی با HD کاملا از یکدیگر جدا، چروکیده و نکروز شده‌اند.



شکل ۴: اثر محافظتی هگزامتیلن تترامین (HMT) در پیش‌گیری از مرگ سلولی ناشی از سولفور موستارد (HD). میزان سلول‌های زنده با استفاده از رنگ‌آمیزی قرمز خنثی (NR) تعیین شده‌اند. HMT به تنهائی، قبل (PreHMT+HD)، همزمان (HMT+HD) یا بعد از HD (HD+postHMT) به‌کار رفته است. داده‌ها برحسب درصد کنترل بیان شده اند. * نسبت به گروه کنترل و † نسبت به HD معنی‌دار است. تعداد نمونه در هر گروه حداقل ۲۴ عدد می‌باشد ($P<۰/۰۰۱$).

لذا نتایج فوق نشان می‌دهد هرچند هر دو روش مصرف HMT قبل و یا همزمان با HD اثر محافظتی برجسته‌ای بر سلول‌های HF2FF دارد، لیکن مصرف HMT قبل از HD اثر محافظتی بیشتری (۳۵درصد در مقابل ۲۹-۲۳درصد) بر سلول‌های فوق ایجاد می‌نماید.

بحث

مطالعه با سلول‌های HF2FF نشان داد این سلول‌ها به‌عنوان مدلی از سلول‌های پوستی انسانی برای ارزیابی اثرات HD و نیز بررسی کارآیی داروهای مختلف و اثرات درمانی احتمالی آن‌ها بر عوارض HD مدلی بسیار مناسب می‌باشند. از سلول‌های فوق می‌توان قبل از مطالعات درون تنی جهت ارزیابی اثرات مفید و نیز اثرات احتمالی مضر و سمی داروها بر سلول‌های فیبروبلاست پوست استفاده نمود. تکثیر سریع، آسان، کم‌هزینه و در دسترس بودن، احتمال ذخیره سلول‌ها و استفاده از عامل با غلظت به‌مراتب کمتر در مقایسه با کشت سلول‌های بافت پوست، از مزایای این مدل می‌باشد.

در ابتدا غلظت‌های مختلف HD برای تعیین غلظت مناسب و LC_{50} به منظور ارزیابی اثر محافظتی ترکیبات از جمله HMT مورد استفاده قرار گرفت. بروز سریع اثرات HD نشان داد که این ماده یکی از سموم بسیار سریع‌الاثر بوده و بویژه در دوزهای بالاتر از۳۰ میکرومولار ظرف کمتر از ۵ دقیقه اثرات مخرب و کشنده بر سلول‌ها ایجاد می‌نماید. این اثر کاملاً وابسته به غلظت بوده و با آن نسبت مستقیم دارد. لیکن بیشترین اثر را در حداقل زمان (۵ دقیقه) ایجاد نموده و پس از آن میزان تغییرات سلول‌های زنده کمتر می‌باشد. به‌عنوان مثال با دوز ۱۰۰۰ میکرومولار در زمان صفر تا ۵ دقیقه میزان کاهش حدود ۷۵ درصد ولی از زمان ۵ تا ۱۵ دقیقه این کاهش حدود ۵ درصد می‌باشد. لذا اثر مرگبار سلولی HD در حداقل زمان ممکن ایجاد می‌گردد. در زمان‌های طولانی‌تر از ۱۵ دقیقه تغییر میزان سلول‌های زنده بسیار کمتر از زمان اولیه است. با توجه به ثابت شدن نسبی اثر HD در زمان‌های ۶۰- ۱۵ دقیقه و گزارش‌های قبلی در این خصوص [۳]، میزان سلول‌های زنده تا ۱ ساعت پس از آلودگی تعیین گردید. زیرا پس از ۳۰ دقیقه اثر معنی‌داری در کاهش تعداد سلول‌های زنده مشاهده نشده است. آثار فوق شاید دال بر چندین محل اثر در سلول باشد. زیرا با افزایش غلظت HD فقط زمان بروز اثرات سمی به‌سرعت کاهش یافته است.

نتایج نشان داد که غلظت ۱۸۰میکرومولار HD برای ارزیابی کارآیی و اثرات محافظتی داروها و مواد ضداکسیدان مناسب

می‌باشد. تغییرات مرفولوژیک سریع سلول‌های HF2FF در برابر دوزهای زیاد HD (۱۰۰۰ میکرومولار) شامل چروکیده شدن و جدایی از یکدیگر به‌علاوه توانایی احتباس رنگ NR احتمال به‌وجود آمدن آپوپتوزیس را که متعاقب شکسته شدن غشاء سلول رخ خواهد داد به ذهن متبادر می‌کند. لیکن مرگ سلولی ناگهانی و سریع تعداد زیادی از سلول‌ها پس از ۵ دقیقه و متناسب باغلظت می‌تواند بیشتر دال بر نکروز سلولی باشد. هر چند اتصال HD به DNA و شکسته شدن DNA سبب فعال شدن آنزیم پلی–ADP– ریبو پلی‌مراز و لذا کاهش NAD^+، ATP و شکسته شدن آن‌ها و سرانجام افزایش رادیکال آزاد اکسیژن و مرگ سلول می‌گردد، لیکن مکانیسم سریع‌تر مرگ سلولی شاید بیشتر به کاهش GSH و الکیلاسیون تیول پروتئین‌ها ارتباط داشته باشد. متعاقب این عمل، HD با غیرفعّال نمودن آنزیم‌ها و نیز پمپ Ca^{2+}-ATPase باعث افزایش سریع کلسیم داخل سلولی شده که متعاقب آن با فعّال شدن اندونوکلئازها و پروتئازها مرگ سلولی ایجاد می‌گردد [۱۲].

مطالعات متعددی اثرات محافظتی HMT را در مدل‌های سلولی مختلف نشان داده‌اند. HMT به همراه گلوتاتیون احیاء سبب محافظت سلول‌های SCK14 (رده سلولی کراتینوسیت انسانی) تا ۷۲ ساعت در مقابل غلظت ۱۰میکرومولار HD شده است. همچنین سلول‌های عمقی ریه شامل ردهٔ سلولی A549 تحت اثرات محافظتی HMT، در مقابل اثرات مخرب HD مقاومت نشان داده و تعداد سلول‌های زنده پس از ۴۸ ساعت بیش از ۹۰درصد افزایش نشان داده‌اند [۳]. مطالعه با سلول‌های لنفوسیت خون انسانی نشان داده که سیستئین اثر محافظتی کمتری در برابر HD ایجاد می‌نماید [۸]. لیکن استرهای سیستئین سبب افزایش این ماده در داخل سلول و کاهش میزان HD موجود در سلول شده و اثرات مخرب و صدمات سلولی را در برش‌های سلول‌های ریه موش صحرایی کاهش داده‌اند. ولی در مواجهه بعدی سلول‌های ریه با HD استرهای سیستئین توانایی محافظت سلول‌ها را نداشته‌اند [۶]. در این مطالعه کاربرد HMT قبل از HD و همزمان با HD میزان سلول‌های زنده را به ترتیب ۱/۸۱ و ۱/۶۸ برابر افزایش داده و پس از آلودگی بی‌تاثیر بوده است. با توجه به نتایج، احتمالاً کاربرد HMT قبل از آلودگی با HD اثرات محافظتی بیشتری نسبت به مصرف همزمان آن خواهد داشت. بنابراین بهتر است این ماده قبل از آلودگی با HD در محیط موجود باشد.

افزایش غلظت HMT به بیش از ۲۵ میلی‌مولار اثرات محافظتی بیشتری از خود نشان نداده است که دال بر اثر محدود HMT می‌باشد. همچنین خارج نمودن HMT از محیط کشت قبل از آلودگی با HD، اثر محافظتی ایجاد ننموده است [۳]. در این خصوص دو احتمال وجود دارد. ۱– شاید HMT توانایی ورود به سلول را نداشته باشد. ۲– احتمالاً HMT موجود در هنگام آلودگی با HD، به‌عنوان یک نوکلئوفیل قوی عمل نموده و با یون سولفونیوم ایجاد شده توسط HD سریعاً و قبل از واکنش با عناصر سلولی، واکنش داده و آن را بی‌اثر می نماید. به‌عنوان یک نتیجه کلی، برای اثربخشی وجود HMT قبل از HD ضروری است.

مقایسه نتایج این مطالعه با مطالعات قبلی با HD و HMT برروی رده سلول‌های عمقی ریه (A549) اثرات تقریباً مشابهی را نشان داده است. هرچند حساسیت سلول‌های فیبروبلاست به‌کار گرفته شده در این مطالعه (HF2FF) نسبت به HD تقریباً مشابه سلول‌های (A549) بوده، لیکن اثرات محافظتی HMT بر سلول‌های ریوی [۳] و افزایش تعداد سلول‌های زنده تا حدودی بیشتر بوده است (در سلول‌هایHF2FF ۱/۸ برابر در مقابل۲ برابر افزایش سلول‌های زنده درسلول‌های A549 با حضور HMT). همچنین با توجه به دوز بکار رفته HD و LC50 (در این مطالعه) سلول‌های فیبروبلاست نسبت به سلول‌های کراتینوسیت رده SVK14 [۵] در مقابل اثرات مخرب HD مقاوم‌تر می‌باشند.

اثر محافظتی HMT نشان می‌دهد که نوکلئوفیل‌هایی غیر از سیستئین یا سایر ترکیبات دارای گروه‌های تیول نیز به‌طور قابل ملاحظه‌ای اثر حفاظتی در مقابل HD ایجاد می‌نمایند. مقایسه اثر این ماده با ترکیباتی نظیر N–استیل سیستئین [۱۳] نشان می‌دهد HMT در مقابله با HD کارآیی بیشتری داشته است. مقاومت بیشتر سلول‌های ریوی ممکن است به ساخت گاماگلوتامیل ترانسفراز (GGT) در سلول‌های اپی‌تلیال آلوئولار تیپ II ارتباط داشته باشد [۱۵، ۱۴]. با توجه به مکانیسم‌های عمل HD و

بیشترین اتصال آن به ملکول گوانین در ساختمان DNA، احتمالاً HMT که خود نیز ۴ اتم N در هر مولکول داشته حداقل اثر نوکلئوفیل برابری با اتم N شماره ۷ حلقه گوانین دارد. HMT احتمالا می‌تواند با اتصال HD به گوانین در ساختمان‌های ملکولی سلول مقابله نموده و اثر محافظتی ایجاد نماید. لذا کارآیی بیشتر HMT در مقایسه با NAC که گروه‌های تیول بیشتری را در سلول احیاء نموده و سطح گلوتاتیون را افزایش می‌دهد شاید به دلیل اثر مستقیم HMT در مواجهه با سولفونیوم بوده در حالی‌که NAC و ملکول‌های مشابه با افزایش و بالا نگه‌داشتن سطح گلوتاتیون سلول قبل از مواجهه با HD عمل می‌نمایند و مقدار گلوتاتیون ممکن است برای مقابله با HD و اثرات سریع و مستقیم آن کافی نبوده وHD بلافاصله از طریق پراکسیداسیون چربی‌ها قبل از واکنش با سایر عناصر سلولی عمل نماید.

با توجه به بروز بسیار سریع واکنش HD با عناصر سلولی، بهترین روش برای مقابله با آن به‌کارگیری مواد محافظ در برابر HD از جمله فرمولاسیون‌های رفع آلودگی نظیر کلرآمید ۳۳۰- S بوده که در محیط‌های قطبی و یا غیرقطبی (روغنی) نیز بلافاصله آن را خنثی می‌نماید [۱۶]. شاید به‌کارگیری همزمان چندماده محافظ از جمله HMT و NAC اثرات به مراتب قوی‌تری ایجاد نمایند که در مراحل بعدی کار مورد ارزیابی قرار خواهند گرفت.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهش دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... «عج» و پژوهشکده طب‌رزمی- مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی انجام گرفته است که بدین وسیله از زحمات همکاران گرامی در آن معاونت و مرکز تقدیر و تشکر به‌عمل می‌آید.

منابع

1- Vijayarahavan R, kumar P, Joshi U, Raza SK, Rao PVL, Malhotra RC, Jaiswal DK. Prophylactic efficacy of amifostine and its analogues against sulphur mustard toxicity. Toxicol 2001;163:83-91.

2- Lindsay CD, Hambrook JL. Disopropyl glutathione ester protects A549 cells from the cytotoxic effects of sulphur mustard. Human & Exp Toxicol 1998;17:606-12.

3- Lindsay CD, Hambrook JL. Protection of A549 cells against the toxic effects of sulphur mustard by hexamethylene tetramine. Human & Exp Toxicol 1997;16:106-14.

4- Cross CL, Innace JK, Krebs Rc, Smith WJ, Meier hl. Sulfur mustard (HD) cytotoxicity in lymphocytes can be affected by intracellular glutathione level. Proceedings of the Medical defense Biosci Rev 1989;p.415-8.reviewe.

5- Smith CN, Lindsay CD. Protection of SVK-14cells by sulphydryl compounds in *vivo* against sulphur mustard cytotoxicity. Human & Exp Toxicol 1996;15:75-6.

6- Smith CN, Lindsay CD, Rice P. The use of full thickness explanted human skin to model sulfur mustard induced skin injury. Human and Exp Toxicol 1996;15:164.

7- Wilde PE, upshall DC. Cysteine esters protect cultured rodent lung slices from sulphur mustard. Human & Exp Toxicol 1994;13:743-8.

8- Gross CL, Innace JK, Hovatter RC, Meier HL, Smith WJ. Biochemical manipulation of intracellular glutathione levels influences cytotoxicity to isolated human lymphocytes by sulfur mustard. cell Biol & Toxicol 1993;9:259-67.

9- Diller WF. Medical phosgene problems and their possible solution. J Occupational Medicine 1978;20:189-93.

10- Arnold R, Humbert B, Werchau H, Gallafi H, Konig W. Interleukin-8, interleukin-6, and soluble tumour necrosis factor receptor type I released from a human pulmonary epithelial virus. Immunol 1994;82:126-33.

11- Griffiths GD, Liudsay CD, Upshall DG. Examination of the toxicity of several protein toxins of plant origin using bovine pulmonary endothelial cells. Toxicol 1994;90:11-27.

12- Papirmeister B, Feister AJ, Robinson SI, Ford RD. Medical defence aginist mustard gas: Toxic mechanisms and pharmacological implications. CRC Press 2000;p.185-90.

13- Black RM, upshall DG. Assessing the danger. Chem in Britain 1988;July,654-664.

14- Juyce M, Steitz TA, Zigmond SH, Borleis J. Synthesis and release of amphipathic gamma-glutamyl transferase by the pulmonary alveolar type 2 cell. The J Biol Chem 1994;142:19-26.

15- Dale AD, Hunry JF. Glutathione in defense and signaling. Annals of the New York Academy of Sciences 2002;973:488-504.

16- Shih ML, Korte WD, Smith GR, Szafraniec LL. Reactions of sulfides with S-330, a potential decontaminant of sulfur mustard in formulations. J Appl Toxicol 1999;1:S83-8.