

## اثر سولفور موستارد بر بافت ریه موش آزمایشگاهی رت

کاظم احمدی<sup>۱\*</sup> Ph.D. و حسن محمد حسینی اکبری<sup>۲\*\*</sup> M.D.

آدرس مکاتبه: \*دانشگاه علوم پزشکی بقیه...<sup>«ع»</sup> - دانشکده پزشکی - گروه ایمونولوژی و پژوهشکده طب رزومی -

مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی - تهران - ایران

\*\*دانشگاه علوم پزشکی بقیه...<sup>«ع»</sup> - دانشکده پزشکی - گروه پاتولوژی و پژوهشکده طب رزومی -

مرکز آسیب‌های شیمیایی - تهران - ایران

تاریخ اعلام وصول: ۱۳۸۴/۵/۱۰ تاریخ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۴/۹/۱ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۱۳۸۴/۹/۱۰

### خلاصه

**مقدمه:** ضایعات انسدادی مجاری تنفسی کوچک و بزرگ، تخریب سلول‌های آلوئولی و تجمع ترشحات، افزایش تعداد سلول‌های پلی مورفونوکلئار و سلول‌های لنفوسیتی و در نتیجه ضایعات غیر قابل برگشت در ریه‌ها، برونشیت و ضخیم شدن فضای بین سلولی از جمله اثرات گاز خردل بر دستگاه تنفس می‌باشد. مطالعات نشان داده که تعداد زیادی از مصدومین شیمیایی جنگ تحمیلی از عوارض شدید ریوی رنج می‌برند. از طرفی با گذشت بیش از یک دهه از مصدومیت این افراد درمان‌های مختلفی بر روی آنها صورت گرفته، به طوری که بعضی از محققین بر این عقیده هستند که نمی‌توان دقیقاً عوارض ریوی را به طور کامل وابسته به اثرات مستقیم گاز خردل دانست. لذا، هدف این مطالعه بررسی اثر گاز خردل بر بافت ریه در حیوان بود. به طوری که فارغ از اثرات تداخلی داروهای مورد استفاده بتوان مستقیماً و به طور مستقل اثر گاز خردل را بررسی نمود.

**مواد و روش کار:** تعداد ۲۴ سر رت با وزن ۱۵۰ گرم و سن ۱۰-۸ هفته به دو گروه ۱۲ تایی تست و کنترل تقسیم شدند. گروه تست با استفاده از قفس مخصوص به صورت استنشاقی به مدت ۵/۰ ساعت در معرض مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول عامل در استون (۱۲۷۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) قرار گرفتند. گروه کنترل در شرایط مشابه در معرض استون قرار گرفتند. رت‌ها در فواصل ۲ و ۴ و ۶ ماه کشته شدند و ریه آنها مورد بررسی پاتولوژی قرار گرفت.

**نتایج:** نتایج نشان داد که پس از ۲ ماه ضایعه ناچیز و قابل مشاهده نمی‌باشد. پس از چهار ماه هیپرپلازی پنوموسیت‌های تایپ ۱ و ۲ در ریه دیده می‌شود ولی ضایعات پیشرفته قابل مشاهده نمی‌باشد. پس از ۶ ماه علاوه بر التهاب حاد و مزمن، ضخیم شدن دیواره آلوئولار نیز مشاهده گردید.

**بحث:** نتیجه آنکه سولفور موستارد در طولانی مدت سبب ضایعات ریوی به صورت التهاب و ضخیم شدن جدار آلوئول‌ها می‌شود.

**واژه‌های کلیدی:** سولفور موستارد، ریه، رت، تک دوز، استنشاقی

## مقدمه

اینترلوکین-۸ (IL-8) افزایش می‌یابد. از طرفی IL-8 یکی از مهم‌ترین عوامل کموتاکسی برای پلی مورفونوکلرها می‌باشد. لذا با افزایش سطح IL-8 و به دنبال آن جذب سلول‌های چند هسته‌ای به منطقه، التهاب نیز به وجود خواهد آمد.

پروتئین‌های محلول (چه فاکتورهای مشتق از خون و چه آنهایی که توسط سلول‌های ارتشاح یافته تولید می‌شوند)، فیبرو بلاست‌ها و دیگر سلول‌های تولید کننده کلاژن را وادار به مهاجرت، تکثیر و یا تولید بیش از حد کلاژن می‌کنند [۱۶].

اخیراً توجه محققین به اثرات گاز خردل بر روی سلول‌های اپی‌تلیال جلب شده و کراتینوسیت‌های آلوده به گاز خردل مدیاتورهایی را از خود ترشح می‌کنند که باعث تجمع لکوسیت‌ها می‌شوند [۱۷].

هدف از این مطالعه بررسی ضایعات ریوی ناشی از گاز خردل در حیوان بود. به طوری که فارغ از اثرات تداخلی داروهای مورد استفاده به منظور درمان بتوان مستقیماً و به‌طور مستقل اثر گاز خردل را بررسی نمود.

## مواد و روش کار

**تهیه سولفور موستارد:** سولفور موستارد با غلظت ۱۲۷۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از وزارت دفاع و پشتیبانی تهیه گردید. بر اساس تجربیات کومار [۱۸] که مقدار ۴۲/۳ میلی‌گرم در متر مکعب عامل را به مدت ۱ ساعت استفاده کرده بود، در این مطالعه بر اساس حجم قفس موجود (۶۷۵۰ سانتی‌متر مکعب) مقدار ۰/۲۸۵ میلی‌گرم برای یک ساعت لازم بود که برای مدت نیم ساعت مقدار ۰/۵۷۱ میلی‌گرم برای یک بار Expose استفاده گردید.

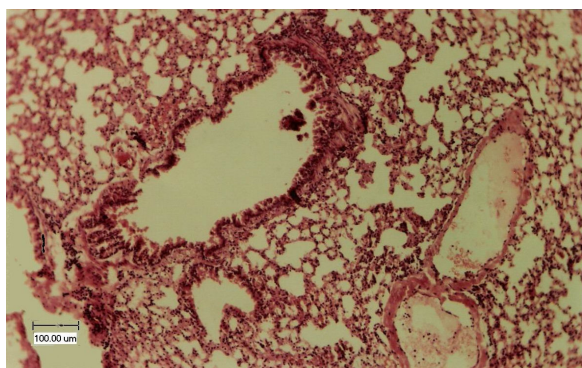
**نگهداری حیوان:** پس از تصویب انجام کار توسط شورای پژوهش و مجوز انجام کار، حیوانات در محل نگهداری حیوانات کوچک در محل مخصوص در دانشگاه علوم پزشکی بقیه... «عج» نگهداری شدند.

**در معرض قرار دادن حیوان:** بدین منظور با توجه به پیش‌بینی آماری برای هر تجربه حداقل سه حیوان لازم بود؛ لذا ۱۲ سر رت انتخاب شدند. تعداد ۱۲ سر رت با وزن ۱۵۰ گرم و سن ۱۰-۸ هفته با استفاده از قفس مخصوص به صورت استنشاقی به مدت

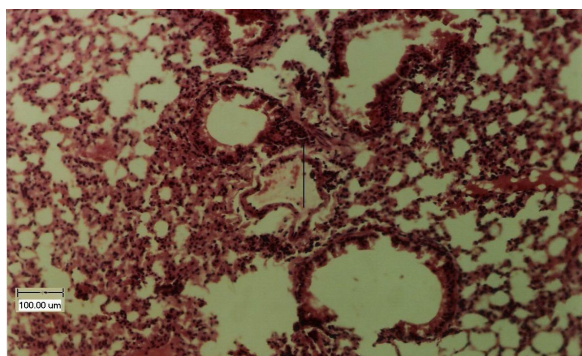
ضایعات انسدادی مجاری تنفسی کوچک و بزرگ، تخریب سلول‌های آلوئولی و تجمع ترشحات، افزایش تعداد سلول‌های پلی‌مورفونوکلتر و سلول‌های لنفوسیتی و در نتیجه ضایعات غیر قابل برگشت در ریه‌ها، برونشیت و بعضاً التهاب فضای بین سلولی از جمله اثرات گاز خردل بر دستگاه تنفس می‌باشد. یکی از علل تأخیر در بهبود زخم‌های حاصل از گاز خردل نسبت به زخم‌های عادی، ناشی از اثر گاز خردل بر سلول‌های لایه بازال است. سولفور موستارد باعث جلوگیری یا کند شدن تقسیم سلولی در لایه بازال شده و در نهایت باعث تخریب لایه‌های فوقانی بدون جبران و ترمیم می‌شود.

سولفور موستارد یک عامل آلکیله کننده الکتروفیلیک با خواص موتاژنیک، کارسینوژنیک، سایتوتوکسیک و تاوول‌زاست [۱، ۲]. پوست، چشم و سیستم تنفسی بیشترین تأثیرپذیری را از گاز خردل دارند [۳، ۴، ۵]. دوز بالای گاز خردل به صورت حاد باعث سرفه، تنگی نفس و گرفتگی ریه‌ها [۴، ۵، ۶] می‌شود. در بعضی از مصدومین ضایعات ریوی، منجر به بیماری ریه شامل آسم، برونشیت مزمن، برونشکتازی و فیبروز می‌شود [۵]. در مطالعه عماد و همکاران [۷] بر روی ۱۹۷ بیماری که در معرض یک دوز سولفور موستارد بودند، نشان داد که ۱۰/۶۵ درصد افراد گرفتار آسم، ۵۸/۸۸ درصد برونشیت مزمن، ۸/۶۲ درصد برونشکتازی، ۹/۶۲ درصد تنگی مجرا ناشی از گرانولاسیون و ۱۲/۱۸ درصد افراد گرفتار فیبروز ریه شده‌اند.

هر چند قسمت زیادی از سولفور موستارد از طریق ادرار دفع می‌شود [۸] ولی سولفور موستارد که یک عامل آلکیله کننده بوده، قدرت اتصال به DNA و RNA و پروتئین‌ها را دارد [۹، ۱۰، ۱۱] و می‌تواند منجر به تغییراتی در سطح ژن‌های بعضی از سایتوکاین‌ها شود که قابل تعمیر نمی‌باشند [۱۲، ۱۳]. Rikimuru و همکاران [۱۴] و Tanaka [۱۵] نیز ثابت کرده‌اند که پس از expose کشت بافت‌های مختلف انسانی و یا خرگوش با سولفور موستارد، رهایش تعداد زیادی از مدیاتورهای این گونه بافت‌ها زیاد می‌شود. Lavdot و همکاران [۱۳] نشان داده‌اند که در محیط کشت پس از برخورد کراتینوسیت‌ها با سولفور موستارد سنتز mRNA برای



شکل ۲: نمای میکروسکوپی از پاتولوژی بافت ریه ۴ ماه پس از آلودگی با خردل



شکل ۳: نمای میکروسکوپی از پاتولوژی بافت ریه ۶ ماه پس از آلودگی با خردل

### بحث

در این مطالعه، ریه رت‌هایی که در معرض یک دوز سولفور موستارد قرار گرفته بودند و همچنین رت‌های گروه کنترل که در معرض حلال قرار داشتند، در زمان‌های مختلف مورد بررسی پاتولوژی قرار گرفت [۱۸]. نتایج پاتولوژی بعد از رنگ‌آمیزی، التهاب و ضخیم شدن دیواره آئول‌ها را نشان داد. این نتایج با یافته‌های دیگران [۷] مبنی بر گرفتاری ریه بعد از یک بار مواجهه (single dose expose) همخوانی دارد. در این تحقیق پس از دو ماه از آلودگی با خردل عارضه پاتولوژیک که باعث نارسایی در ریه شود دیده نشد. ضایعات پاتولوژیک به صورت التهاب پس از چهار ماه و ضایعاتی که نشانگر پیشرفت ضایعات باشد، حتی پس از ماه ششم دیده نشد. بدیهی است با توجه به مشکلات نگهداری رت‌ها به مدت طولانی نتیجه‌گیری قطعی در مورد عدم وجود ضایعات

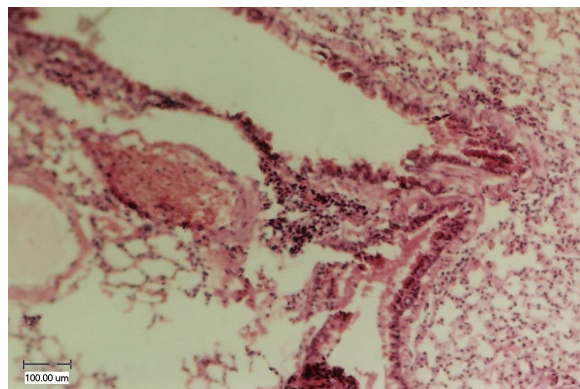
۰/۵ ساعت در معرض مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول عامل در استون (۰/۵۷۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) قرار گرفتند.

**گروه کنترل:** ۱۲ سر حیوان با شرایط مشابه در معرض حلال قرار گرفتند.

**تهیه نمونه بافتی:** رت‌های گروه تست و کنترل در فواصل ۴،۲ و ۶ ماه کشته و ریه آنها جدا گردید. نمونه‌ها پس از جدا شدن در محلول فیکساتیو فرمالین ۱۰ درصد به مدت یک هفته قرار گرفتند. پس از مراحل آماده‌سازی بافت توسط دستگاه دستگاه Processing و قالب‌گیری نمونه‌ها، با استفاده از دستگاه میکروتوم روتاری Leit 2، مقاطعی به ضخامت ۵ میکرون برش زده شد. برای مطالعات بافت شناسی، مقاطع با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، تولوئیدین بلو، و ان گیس رنگ‌آمیزی شدند.

### نتایج

نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی به روش هماتوکسیلین و ائوزین (H & E) و همچنین رتیکیلین تریکروم (Reticulin Trichrome) در لام‌های تهیه شده از بافت ریه حیوان پس از ۲ ماه از آلودگی با گاز خردل، نشان داد که ضایعه در این مدت ناچیز و قابل مشاهده نمی‌باشد. پس از چهار ماه، هیپرپلازی پنوموسیت‌های تایپ ۱ و ۲ در ریه دیده شد ولی فیروز قابل مشاهده نبود. پس از ۶ ماه، علاوه بر التهاب حاد و مزمن، ضخیم شدن دیواره آئولار نیز مشاهده گردید (شکل‌های ۱، ۲، ۳). نتایج حاصل از گروه کنترل ضایعه مشخصی را نشان نداد.



شکل ۱: نمای میکروسکوپی از پاتولوژی بافت ریه در گروه کنترل

به دنبال آن جذب سلول‌های چند هسته‌ای به منطقه، التهاب نیز به وجود خواهد آمد. در این رابطه نقش نیتریک اکساید (NO) نیز نباید نادیده گرفته شود. گزارشات نشان داده که افزایش سطح NO با بروز ضایعات مرتبط می‌باشد [۲۰، ۲۱].

بنابراین با توجه به یافته‌های سایر همکاران مبنی بر افزایش سطح mRNA-IL-8 [۱۳] و NO توسط سلول‌های ماکروفاژی و نقش مجموعه سایتوکاین‌های مترشحه توسط سلول‌های T و ماکروفاژها در ایجاد ضایعات ریه [۲۲، ۲۶] و یافته‌های تحقیقات اخیر که نشان دهنده تغییرات سایتوکاین‌های مترشحه توسط سلول‌های فوق در رت‌های آلوده به خردل در مقایسه با گروه کنترل بود (در دست چاپ)، می‌توان نتیجه گرفت که پس از اتصال خردل با هدف خود تغییراتی در سطح ژنی به وجود می‌آید که این تغییرات از یک طرف باعث افزایش سطح تعدادی از مدیاتورهای دخیل در ایجاد ضایعات ریوی شده و از طرفی تغییرات سطح ژنی و اختلال در سیستم مکانیزم تعمیر بافت ریه منجر به پایداری ضایعات ریوی و غیر قابل برگشت بودن تخریب بافتی در غیاب عامل می‌شود.

### پیشنهاد

با توجه به نتایج کار پیشنهاد می‌شود که در مطالعات آتی چند گروه حیوان در معرض دوزهای مختلف و تعداد دفعات متفاوت قرار گیرند. موش‌های بیشتری در گروه‌ها گنجانده شده و حیوانات در فواصل متعدد بررسی شوند. همچنین مطالعات هیستوپاتولوژی با روش‌های پیشرفته صورت گیرد.

### تشکر و قدردانی

در اینجا لازم می‌دانیم از مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی پژوهشکده طب رزمی به جهت حمایت امور اجرایی پروژه و معاونت پژوهش دانشگاه و اداره تحقیقات ستاد مشترک سپاه به خاطر حمایت مالی از پروژه کمال تشکر و قدردانی را داشته باشیم.

پیشرفته آسان نمی‌باشد. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، فقط می‌توانیم بگوییم پس از ۶ ماه آلودگی با یک دوز گاز خردل ضایعات پیشرفته در ریه محرز نشد. این نتایج با یافته‌های نوع انسانی هم‌خوانی دارد. در این رابطه عماد و همکاران [۷] عوارض مختلفی را پس از یک دوز expose ارائه داده‌اند. همچنین قانعی و همکاران در سال‌های اخیر [۸] نیز یافته‌های متفاوتی از عوارض ریوی شامل برونشیت مزمن، برونشیلیت، برونشکتازی و تنگی در تراشه را ارائه داده‌اند. در این رابطه عماد و همکاران فقط در ۱۲/۱۸ درصد موارد را به فیروز ریه نسبت داده‌اند.

در این تحقیق وجود التهاب و سختی دیواره آلوئول‌ها مشاهده شد. نکته جالبی در اینجا نهفته است مبنی بر این که نوع انسانی در طی سالیان طولانی انواع مختلفی از داروها را جهت درمان دریافت نموده‌اند. لذا عارضه ریوی می‌تواند متفاوت از مدل حیوانی باشد. یکی از دلایل روی آوردن به مطالعه حیوانی در این تحقیق نیز یافتن همین نکته بود که ببینیم آیا عارضه ریوی در مدل انسانی تماماً وابسته به گاز خردل است و یا این که درمان‌های متفاوت نیز در روند بیماری دخیل بوده‌اند. اما این که چرا ضایعات ریوی ایجاد شده توسط سولفورموستارد متفاوت از سایر عوامل به وجود آورنده از جمله سیگار می‌باشد، می‌تواند دلیل ایمونولوژی داشته باشد. در حالات غیر خردلی برخورد آنتی‌ژن باعث رهایش سایتوکاین‌های چند منظوره از سلول‌های T و سلول‌های پردازش کننده آنتی‌ژن (ماکروفاژها) می‌شود. این برخورد ماکروفاژها و سلول‌ها در داخل ریه منجر به آلوئولیت می‌شود. با برداشت آنتی‌ژن (حذف آنتی‌ژن) آلوئولیت ناپدید می‌شود، ولی حضور دایمی آنتی‌ژن منجر به گرانولوما، آسیب بافتی و ضایعات پیشرفته ریه می‌شود [۱۹].

Lavdot و همکاران [۱۲] نشان داده‌اند که در محیط کشت پس از برخورد کراتینوسیت‌ها با سولفورموستارد سنتز mRNA برای IL-8 افزایش می‌یابد. از طرفی IL-8 یکی از مهم‌ترین عوامل کموتاکسی برای پلی مورفونوکلرها می‌باشد. لذا، با افزایش سطح IL-8 و

### منابع

1- Somani SM and Babu SR. Toxicodynamics of sulfur mustard. Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol 1989;27:419-435.  
2- Wormser U. Toxicology of mustard gas. Trends pharmacol Sci

1991;12:164-167.  
3- Ashkenazi I, Blumenthal HI and Asni I. Mustard Gas injuries of the eyes. Harefuah 1991;120:279-283.



- 4- Smith WJ and Dunn MA. Medical defense against blistering chemical warfare agents. *Arch Dermatol* 1991;127:1201-13.
- 5- Emad A and Rezaian GR. Immunoglobulins and cellular constituents of BAL fluid of patients with sulfur mustard gas induced pulmonary fibrosis. *Chest* 1999;115:1346-51.
- 6- Iwaszkiewicz J. Burns of the upper respiratory tract due to mustard gas. *Otolaryngol. Pol* 1966;20:237-41.
- 7- Emad A and Rezaian GR. The diversity of the effect of sulfur mustard gas inhalation on respiratory system 10 years after a single heavy exposure (Analysis of 197 Cases). *Chest* 1997;112:734-38.
- 8- Ghanei M, Panahi Y, Aslani J and Mojtahedzadeh M. Successful treatment of pulmonary obstructive lesion in chemical warfare casualties with gamma-interferon. *Kosar Medical Journal* 2003;8(2):21.
- 9- Sanderson BJS and Shield AJ. Mutagenic damage to mammalian cells by therapeutic alkylating agents. *Mutation research* 1996;355:41-57.
- 10- Kisby GE, Springer N and Spencer PS. In vitro neurotoxic and DNA-damaging properties of nitrogen mustard. *J Appl Toxicol* 2000;1:S35-41.
- 11- Langenberg JP, Van der Schans GP, Spruit HE, Kuijpers WC, Mars-Groenendijk RH, Van Dijk-Knijnenburg HC et al. Toxicokinetics of sulfur mustard and its DNA-adducts in the hairless guinea pig. *Drug Chem Toxicol* 1998;21(1):131-47.
- 12- Mutsaers SE, Bishop JE, McGrouther G and Launet GJ. Introductory overview in mechanisms of tissue repair : from wound healing to fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29:5-17.
- 13- Lardot C, Dubois V and Lison D. Sulfur mustard upregulates the expression of interleukin-8 in cultured human keratinocytes. *Toxicology letters* 1999;110:29-33.
- 14- Rikimaru T, Nakamura M and Yano T. Mediators initiating the inflammatory response released in organ culture by full-thickness human skin explants exposed to the irritant sulfur mustard. *J Invest Dermatol* 1991;96:888-97.
- 15- Tanaka F, Dannenberg AM and Higuchi K. Chemotactic factors released in culture by intact developing and healing skin lesions produced in rabbits by the irritant sulfur mustard . *Inflammation* 1997;21:251-267.
- 16- Marshall RP, McAnulty RJ and Laurent GJ. The pathogenesis of Pulmonary Fibrosis: Is There a Fibrosis gene? *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29(1):107-120.
- 17- Vara Ak, Laurent CJ, NGO V, Sweeney JF and Levitt JM. Sulfur mustard primes phagocytosis and degranulation in human polymorphonuclear leukocytes. *Int Immunopharmacol* 2004;4(3):437-45.
- 18- Kumar Om, SugendranK, Vijayaraghavan R. Protective effect of various antioxidants on the toxicity of sulfur mustard administered to mice by inhalation or percutaneous routes. *Chemico-Biological interactions* 2001;134:1-12.
- 19- Menzato G, Adami F, Maschio N and Agostini C. Immune mechanisms in interstitial lung diseases. *European Journal of Allergy and clinical Immunology* 2000;55(12):1103-1120.
- 20- Dey RD, Stanley C, Hames J, Durham J, Castranova V, Hubbs A et al. Inhaled silica dust increases Nitric Oxide and cytokine production associated with collagen synthesis and fibrosis in rats. *App. Occup. Environ. Hyg* 1996;11(7):914-918.
- 21- Yung GL, Kriett JM, Jamieson SW, Johnson W, Newhart J, Kinningger K et al. Outpatients inhaled Nitric Oxide in a Patient with idiopathic pulmonary fibrosis : A bridge to lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*, 2001;20:1224-27.
- 22- Mills BG, Angelica F and Brien E. Cytokines associated with the pathophysiology of aggressive fibromatosis. *J Orthopaed Res* 2000;18(4):655-700.
- 23- Huaux F, Lardot C, Mohammed A and Delos M. Lung fibrosis induced by silica particles in NMRI mice is associated with an upregulation of the p40 subunit of interleukin-12 and Th-2 manifestations. *Am J Respir cell Mol Biol* 1999;20(4):561-70.
- 24- Gray WH and Arnold R. IL-9 and Lung fibrosis: A Th2 good guy. *Am J Respir cell Mol Biol* 2001;24(4):365-69.
- 25- Mahmmmed A, Huaux F, Vink A, Delos M, Coutelier JP, Many MC et al. Interleukin -9 reduces lung fibrosis and type 2 immune polarization induced by silica particle in a murine model. *Am J Respir cell Mol Biol* 2001;24:368-75.
- 26- Chen ES, Greenlee BM, Wills-karp M and Moller DR. Attenuation of lung inflammation and fibrosis in interferon-gamma-deficient mice after intratracheal bleomycin. *Am J Respir cell Mol Biol* 2001;24:545-55.