طب‌نظامی
زمستان ۱۳۸۳، شماره ۶ (٤)
صفحات: ۲۵۳-۲٤۹

اثر سولفورموستارد برسلول‌های جامی ایلئوم موش بزرگ صحرایی

حسین بهادران[۱]*.Ph.D.، حسین دشت نورد[۲]*.Ph.D.، محمد حسین اسدی[۳]*.Ph.D.، حسین ایمانی[۴]*.Ph.D.، همایون صدرایی[۵]*.Ph.D.، غلامرضا کاکا[۶]*.M.Sc.، محمود مفید[۷]*.M.Sc.، حسین مهدوی نسب[۸]*.M.Sc. و عباس محمودزاده[۹].Ph.D.**

*آدرس مکاتبه: * دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج» - دانشکده پزشکی - گروه آناتومی - تهران - ایران*

*** دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج» - دانشکده‌پزشکی - گروه میکروبیولوژی - تهران - ایران***

تاریخ اعلام وصول: ۱۳۸۳/۸/۱۶ تاریخ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۳/۱۲/۶ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۱۳۸٤/۲/۸

خلاصــه

مقدمــه: گاز خردل، سیتوتوکسیک وژنوتوکسیک است. این ماده باعث ضایعات نکروزی سلول‌های پوششی دستگاه تـنفس و گـوارش می‌گردد. اسهال شدید و کاهش تعداد سلول‌ها و وزن بدن را به‌همراه دارد. نظر به اهمیت ایلئوم در جذب یون‌ها و الکترولیت‌ها و نیز نقش سلول‌های جامی، بر آن شدیم تا اثر خردل بر روی این سلول‌ها را مورد مطالعه قرار دهیم.

روش کار: در ایـن مطالعه تعداد ۶۶ رأس موش بالغ از نژاد Albino Nmri به وزن ۲۰ ± ۲۰۰ گرم انتخاب و به‌طور تصـادفی بـه ۵ گـروه تقسـیم شدند. گروه اول کنترل، گروه دوم دریافت‌کننده حلال، به‌عنوان‌گروه شم و ۳ گروه دیگر بـه‌ترتیـب مقدار ۲/۵، ۵ و۱۰ mg/kg گاز خردل به‌صورت تزریق داخل صفاقی (IP) دریافت کردند. در روزهای دوم و پانـزدهم (هفـته دوم) و پـنجاه و هفـتم (هفـته هشتم) موش‌ها کشته و تشریح شدند. سپس از ایلئوم آنها نمونه‌برداری انجـام شد. از نمونه‌ها پس از فیکس و قالب‌گیری، برش‌های متوالی به ضخامت µm ۵ تهیه و با هماتوکسیلین ائوزین و Alician blue رنـگ‌آمـیزی شـد. بـرای بررسـی از Eye piece و سـت نرم‌افزاری و سخت‌افزاری Motic استفاده گردید.

نتایج: این تحقیق نشان داد، خردل باعث کاهش وزن شدید در کوتاه مدت شده ولی در دراز مدت، میزان کاهش روند نزولی دارد. همچنین باعث ریزش پرزها و ارتشاح سلول‌های آماسی شده و نیز بر روی سلول‌های جامی بافت پوششی ایلئوم اثر کرده و کاهش آن را به دنبال دارد (P< ۰/۰۰۱).

۱- استادیار - دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج» - (نویسنده مسئول)
۲- استادیار - دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج»
۳- دانشیار - دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج»
۴- استادیار - دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج»
۵- استادیار - دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج»
٦- عضو هیئت علمی - دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج»
۷- عضو هیئت علمی - دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج»
۸- کارشناس ارشد - دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج»
۹- دانشیار - دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج»

بحث: کاهش سلول‌های جامی در گروه ۲/۵ mg/kg و زمان بیست و چهار ساعت معنی‌دار نبود که احتمالاً به دلیل اثرات کم سمیت این دوز است. اما تعداد سلول‌های جامی در گروه‌های ۵ و ۱۰ mg/kg با زمان ۲۴ ساعت در مقایسه با گروه شم کاهش نشان داد که این معنی‌دار بود (p< ۰/۰۰۱). این کاهش به علت مرگ سلول‌های ریشه‌ای و توقف تقسیم سلولی است. با توجه به نقش اساسی سلول‌های ریشه‌ای در تولید سلول‌های گابلت و در نتیجه محافظت از سلول‌های پوششی، این موضوع باید بیشتر مورد بررسی قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: سولفورموستارد، ایلئوم، سلول جامی، موش بزرگ صحرایی

مقدمه

در جنگ جهانی اول (WWI) از عوامل شیمیایی به‌عنوان سلاح تاکتیکی و تخریبی استفاده شد. در این جنگ از سولفورموستارد به‌علت خصوصیت تاول‌زایی آن بیشتر از سایر عوامل استفاده گردید [۱]. از آغاز جنگ جهانی اول تا پایان آن ۴۰۰/۰۰۰ بار گاز سولفورموستارد علیه نیروهای فرانسه استفاده شده است [۲]. مرگ و میر در روزهای اول و دوم به علت آسیب سیستم تنفسی و برونکوپنومونی بوده است [۳]. مصر در سال‌های۶۷-۱۹۶۳ علیه یمن از سولفورموستارد استفاده کرده است [۴]. از سال ۱۹۸۴ در جنگ تحمیلی، عراق بارها علیه ایران از این گاز در جبهه‌ها و شهرهای مرزی استفاده کرده است [۵]. گزارش‌های متعددی از آلودگی به این ماده بر روی کارگران شاغل در محل‌های مختلف تولید این ماده [۶] و همچنین کارمندان شاغل در بخش‌های تحقیقاتی مرتبط با گاز سولفورموستارد [۷] منتشر شده است. از طرفی این ماده به‌عنوان یک سلاح تروریستی نیز مطرح است [۶]. در جنگ جهانی دوم (WWII) نیز از این ماده استفاده شده است. سولفورموستارد به‌عنوان عامل آلکیل‌کننده DNA که در دوز کم سیتوتوکسیک است، شناخته شده است. در حالی که نیتروژن‌موستارد را به‌عنوان عامل ژنوتوکسیک می‌شناسند که می‌تواند موتاسیون ایجاد کند [۸، ۹]. در آزمایشگاه سرطان‌زایی هر دو ماده (بر روی موش) نشان داده شده است. تومور در موش‌های آلوده به سولفورموستارد نسبت به گروه کنترل بیشتر بوده است [۱۰]. تزریق زیر جلدی سولفورموستارد در محل تزریق، نئوپلاسم ایجاد نموده است [۱۰، ۱۱].

اگرچه اطلاعات مفیدی از اثرات حاد سولفورموستارد در دست می‌باشد، ولی در مورد اثرات دیررس آن اطلاعات کافی در دست نیست. به همین دلیل در مورد عوارض تأخیری سولفورموستارد در انسان شناخت کمتری وجود دارد. از آنجا که جانبازان شیمیایی که با سولفورموستارد تماس داشته‌اند، با مشکلات متعدد تنفسی، گوارشی و خونی روبرو بوده و در اثر عوارض دیررس این گاز جان خود را از دست می‌دهند [۱۲، ۱۳]، بررسی عوارض دیررس آن ضروری به‌نظر می‌رسد.

مطالعات نشان می‌دهد، سولفورموستارد پس‌از تزریق در بافت چربی، کلیه، کبد، ریه، معده و روده کوچک دیده شده است [۱۴]. در مشاهدات میکروسکوپ نوری گزارش شده است، ۶ ساعت پس از تماس با سولفورموستارد اپی‌تلیوم تراکوبرونکیال تخریب شده و پس از ۲۴ ساعت واکنش سلول‌های آماسی و ارتشاح آن همراه با تخریب سلول‌های موکوسی و گابلت گزارش شده است [۱۵]. همچنین ۲۴ ساعت پس از تزریق داخل صفاقی (IP) یا وریدی سولفورموستارد در موش‌های صحرایی، ضایعات شدید گوارشی مانند التهاب و ادم مخاط، ریزش پرزها، ضایعات نکروزی سلول‌های پوششی، توقف تقسیم سلولی، کاهش وزن و در نهایت مرگ موش‌ها گزارش شده است [۱۵]. اثرات سولفورموستارد بر دستگاه گوارش به‌صورت تهوع، استفراغ، بی‌اشتهایی، اسهال و زخم‌های متعدد در لوله گوارش بوده که به دنبال آن میکروارگانیسم‌ها وارد مخاط و زیر مخاط می‌شوند [۱۶، ۱۷، ۱۸].

نظر به اهمیت ایلئوم در جذب مواد، به‌خصوص جذب یون‌ها، الکترولیت‌ها و آب [۱۹] و نیز نقش سلول‌های گابلت که کار تسهیل حرکت مواد و حفاظت مخاط را به‌عهده دارند [۲۰]، بر آن شدیم که اثر سولفورموستارد بر سلول‌های گابلت ایلئوم را بررسی‌نماییم.

مواد و روش‌ها

در ایـن تحقـیق تعداد ۶۶ رأس موش بالغ از نژاد Albino Nmri به وزن۲۰± ۲۰۰ گرم انتخاب و به‌طور تصادفی در ۵ گروه تقسیم و در حـیوان‌خانه تحت شرایط یکسان از نظر غذا، نور و حرارت نگهداری شـدند. چـون سولفورموسـتارد در حـلال‌هـای آلی مانند الکل و اتر محلـول مـی‌باشد، ابتدا سولفورموستارد در حلالی به نام بافر تیرودوز حـل گـردید. محلـول تیرودوز به‌صورت زیر آماده شد: سدیم کلراید ۰/۸g، کلسـیم کلـراید ۰/۰۲g، گلوکـز ۰/۳ g و سـدیم سـولفات ۰/۰۰۵g در آب مقطر حل نموده و به حجم ^{cc}۱۰۰ رسانده شد. آنگاه در دمای ۴ درجه، گلیسرول ۳۷ درصد به مقدار ۰/۰۵ میلی‌لیتر به آن اضافه شد.

یـک گـروه از موش‌ها به‌عنوان کنترل، هیچ ماده‌ای دریافت نکردند. گـروه دوم به عنوان شم (شاهد) فقط حلال دریافت کرد. به ۳ گروه باقـیمانده بـا نـام گـروه تجربـی، دوزهـای ۲/۵، ۵ و ۱۰ mg/kg سولفورموستارد به‌صورت داخل صفاقی (IP) تزریق‌گردید. در هر دوز مـوش‌هـا بـه گـروه‌هـای ۲۴ ساعت، دو هفته و هشت هفته تقسیم شـدند (جمعـاً ۹ گروه). پس از سپری شدن زمان مورد نظر، موش‌ها کشـته شده و مورد تشریح و نمونه‌برداری قرارگرفتند. سپس مراحل هیسـتوتکنیک و قالـب‌گـیری انجـام‌گرفـت. از نمونـه‌ها، برش‌های متوالـی بـه ضـخامت ۵ µm تهـیه و بـا هماتوکسـیکین‌ائوزیـن و Alicianblue رنگ‌آمیزی شدند.

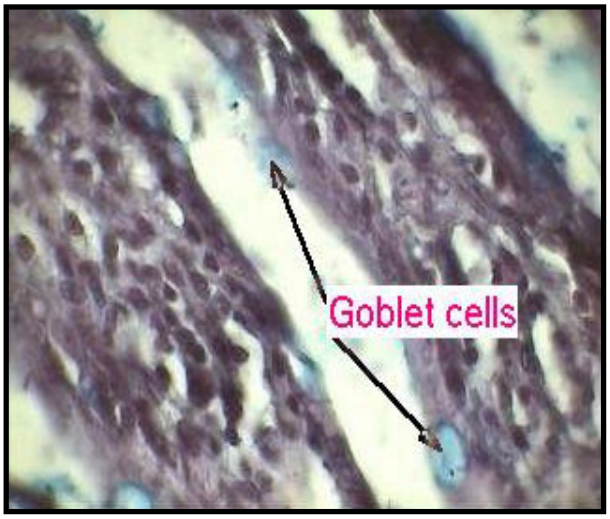
بـــرای بررسـی کمـی – کیفـــی و مورفولوژیک از میکروسکـــوپ نـــــوری Zenit مجهـــــز بـــــه گراتـــــیکول چشـــــمی (Holland Eye Piece HWF-I OX) و سـت نـرم‌افـزاری و سـخت‌افـزاری motic استفاده گردید. نتایج حاصل از این تحقیق با آزمون T-test مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج

موش‌های گروه‌های آزمایش، گوشه‌گیر و بی‌اشتها بوده و نیز کاهش وزن داشـتند. ایـن پدیـده در همه دوزها و در دو هفته چشمگیر بود. ولـی در زمـان هشت هفته با همین دوزها از میزان آن کاسته شد. از نظر هیستوپاتولوژی التهاب، ادم، پرخونی در لامیناپروپریای مخاط و بافـت همبـند همـراه بـا بهم خوردن نظم سلولی دیده شد. پرزهای ایلئوم ریزش داشت و از نظر اندازه (ارتفاع و ضخامت) نامنظم بودند. عروق لنفاوی آنها متسع شده و فواصل این عروق از هم نامنظم بود. ناحـیه زیـر مخـاط و کوریـون تحـت نفـوذ سلول‌های آماسی قرار گرفته بـــود (شکل ۱).

شـکل ۱: (گـروه کنـترل) سـلول‌هـای جامی شکل ناحیه پرزهای ایلئوم (محل فلـش) دیـده مـی‌شود. نظم سلولی و تراکم سلول‌های ناحیه لامیناپروپریا طبیعی است.

پـلاک‌هـای پیـــر (Payer's patches)، علاوه بر داشتن سلول‌های لنفوسـیت به میزان زیاد دارای سلول‌های پلی‌مورف و نکروتیک بود (شکل ۲).



شکل ۲: گروه ۵ mg/kg هشت هفته‌ای – تعداد سلول‌های جامی شکل (محل فلـش) نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است. بهم ریختگی و ریزش سلولی و وجود سلول‌های التهابی در لامیناپروپریا مخاط دیده می‌شود.

سلول‌های جامی در گروه‌های تجربی نسبت به شم کاهش نشان داد. در گروه ۲/۵ mg/kg با زمان ۲۴ ساعت این کاهش در مقایسه با شم معنی‌دار نبود. ولی در دوزهای ۵ و ۱۰ mg/kg و همین زمان کاهش تعداد سلول‌های جامی در مقایسه با گروه شم معنی‌دار بود (جدول ۱).

مقایسه تعداد سلول‌های جامی در گروه کنترل و شم نسبت به هم تفاوت معنی‌داری نداشت (P<۰/۰۰۱). تعداد سلول‌های جامی در گروه‌هایی که دوز ۲/۵ mg/kg دریافت داشتند، در زمان دو هفته و هشت هفته کاهش نشان داد. این کاهش در مقایسه نسبت به گروه شم و با گروه دوز ۲/۵ mg/kg و در زمان بیست و چهار ساعت معنی‌دار بود.

در گروه‌های با دوز ۵ و۱۰mg/kg زمان دو هفته و هشت هفته در مقایسه با گروه تجربی تعداد سلول‌های جامی کاهش نشان داد. تعداد سلول‌های جامی در هر سه روز و روزهای مشابه (بجز دوز ۲/۵ mg/kg با زمان ۲۴ ساعت) نسبت به گروه شم کاهش معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۰۱).

جدول ۱: میانگین سلول‌های جامی در گروه‌های مختلف آزمایشی

دوز	شم	۲/۵mg/kg			۵mg/kg			۱۰mg/kg		
زمان	شم	روز دوم	۱۵ روز	۵۷ روز	روز دوم	۱۵ روز	۵۷ روز	روز دوم	۱۵ روز	۵۷ روزه
میانگین تعداد سلول	۱۲	۱۱/۸	***۷/۶۲	***۷/۰۸	***۸/۱۶	***۷/۴۱	***۶/۲۶	***۷/۵۰	***۶/۵۱	***۶/۳۷

*** (P<۰/۰۰۰۱)

بحث

در این مطالعه موش‌ها به طریق IP (تزریق داخل صفاقی) و با دوزهای ۲/۵، ۵ و ۱۰ mg/kg در معرض سولفورموستارد قرارداده شدند. عوارض بالینی آن به‌صورت انزوا، بی‌اشتهایی و کاهش وزن بود. کاهش وزن در تمامی گروه‌های تجربی، ۲۴ ساعت پس از تزریق مشهود بوده و با افزایش دوز، کاهش وزن نیز بیشتر مشاهده شد. اما در زمان هشت، هفته کاهش وزن به شدت گروه دو هفته نبود. نتایج حاصل با گزارشات قبلی محققین هم‌خوانی داشت [۱۱، ۲۱]. دلیل احتمالی افزایش وزن بدن در گروه‌های هشت هفته به‌علت تقلیل تأثیر سولفورموستارد می‌باشد. زیرا مطالعات نشان می‌دهد، نیمی از سولفورموستارد، پس از تزریق، در بیست و چهار ساعت اول وارد ادرار می‌شود و بخشی از نیمه باقیمانده نیز در طول یک هفته به تدریج دفع می‌شود [۲۲]. با دفع سولفورموستارد بی‌اشتهایی حیوان کاهش پیدا کرده و میل به مصرف غذا از یک طرف و ترمیم سلول‌های پوششی مخاط از طرف دیگر، دلیل افزایش وزن در طول هشت هفته می‌شود. مشاهدات ما نشان داد که ضایعات میکروسکوپی سولفور موستارد در ایلئوم به‌صورت ادم، پرخونی، ریزش پرزها، نکروز، ارتشاح سلول‌های آماسی تک‌هسته‌ای و توقف تقسیم سلولی می‌باشد. این ضایعات وابسته به دوز و زمان است. این مشاهدات در گزارش محققین دیگر نیز آمده است [۱۵، ۱۸].

کاهش تعداد سلول‌های جامی در گروه ۲/۵ mg/kg و زمان بیست و چهار ساعت معنی‌دار نبود که احتمالاً به‌دلیل کم بودن اثر این دوز است. اما تعداد سلول‌های جامی در گروه‌های ۵ و ۱۰ mg/kg با زمان ۲۴ ساعت در مقایسه با گروه شم کاهش نشان داد که این کاهش معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۱). در گروه‌های با دوز ۲/۵ و ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر حسب کیلوگرم و در زمان‌های دو هفته و هشت هفته از نظر آماری تعداد این سلول‌ها در مقایسه با گروه شم کاهش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۰۱). این کاهش احتمالاً به‌علت مرگ سلول‌های ریشه‌ای و توقف تقسیم سلولی است [۲۳]. گروه‌های تجربی نیز از نظر کاهش سلولی با هم تفاوت داشتند. مثلاً در دوز ۵ mg/kg و با زمان ۲۴ ساعت، دو هفته و ۸ هفته کاهش سلولی روندی خاص داشت که وابستگی آن را به زمان نشان می‌دهد. این کاهش معنی‌دار بود. این پدیده نشان می‌دهد، سلول‌های گابلت بازسازی نشده و با توجه به این‌که میانگین دوره تجدید و نوسازی سلول‌های پوششی روده حدود ۴ روز است [۲۰]، سلول‌های جامی

پس از گذشت دو هفته تجدید نشده‌اند. این نتایج با گزارشات بالینی بلالی همسو است [۱۶].

بدین ترتیب اپی‌تلیوم روده تخریب شده و کار فیزیولوژیک جذبی ایلئوم مختل می‌شود. از آنجا که نقش سلول‌های گابلت در محافظت و جلوگیری از تخریب و نیز بازسازی اپی‌تلیوم پوششی پس از تخریب اساسی است، به‌نظر می‌رسد، سولفورموستارد با از بین بردن سلول‌های ریشه‌ای [۲۳، ۲۴]، باعث کاهش تعداد سلول‌های جامی و در نتیجه باعث جلوگیری از نقش محافظتی این سلول‌ها شده که این عمل خود به تخریب بیشتر سلول‌های اپی‌تلیوم پوششی کمک می‌نماید.

منابع

تحمیلی‌عراق علیه ایران. مجله طب نظامی پاییز و زمستان ۱۳۷۹. شماره ۲. صفحات: ۱۰۵-۱۰۱.

۱۳- حلی‌ساز محمدتقی. بررسی نقش عوامل جنگی شیمیایی در ایجاد نوروپاتی. مجله طب نظامی ۱۳۸۲. شماره ۸. صفحه: ۲۶-۳۹.

1- World Health organization. Health aspects of chemical and Biological weapons.Geneva switzed: world health organization; 1970. p.23-4.

2- Pechura CM, Rall DP. Veterans at Risk, the health Effects of Mustard Gas and lewisite.Washington, DC: National Academy Press 1983;9:29-33,53-54.

3- Papirmeister B, Feister AJ, Orbinson SI. Medical defense against mustard Gas: Toxic mechanism and pharmacological implications. Boca raton, FI: Press 1991;31:102.

4- Medema J. Mustard Gas. The science of H. Nucl. Biol chem Def Technol Int 1986;1(4): 66-71.

5- Kadivar H. Adams S. Treatment of chemical and biological warfare injuries: Insights derived from the 1984 iraqi attack on Majnoon Island. Mil Med 1991;156:171-177.

6- Baronian C. Chemical stockpile disposal program: draft programmatic environmental impact statement. Program manager for chemical demilitarization. Aberdeen proving ground, MD. 1984.

7- Marshall E. Iraq's chemical warfare. Case Proved Sci 1984;224:130-2.

8- Heston WE, Levillan WD. Pulmonary tumors in strain a mice exposed to Mustard gas. Proc. Soc Exp Biol 1953;82: 457-460.

9- Heston WE. Carcinogenic action of the mustard. J Nat Cancer Inst 1950;11: 415-423.

10- Heston WE. Occurrence of tumors in mice injected with sulfur mustard and nitrogen mustard. J Nat 1953;14:131-140.

11- Sasser LB, Cuching JA and Dacre JC. Dacre. Two generation reproduction study of sulfurmustard in Rats. J Re Productive Toxicol 1996; 311-319.

۱۲- پژوهی محمد، زهیر محمدحسن، شیخ‌الاسلامی فرزانه. بررسی اثرات سولفورموستارد بر میزان برخی از هورمون‌ها در مجروحین شیمیایی جنگ

14- Maisonneuve A, Callebat I, Debordes L, Coppet L. Distribution of [14c] sulfur mustard in rats after intravenous exposure. Toxicol Appl Pharmaco 1994 Apr;125(2):281-7.

15- Pant SC, Vijayaraghavan R. Histomorphological and histochemical alterations following short-terminhalation exposure to sulfur mustard on viscera organs of mice. Biomed Environ Sci 1999 Sep;12(3): 201-13.

16- Balali M. Clinical and laboratory finding in the iranian figters with chemical gas. Arch Beges 1984 (suppl);102: 254-9.

17- Smith WD and dunn MA. Medical defense agent blistering chemical warfare agents. Ach Dermato; 1943. P.121-7.

18- Mandle M and Gibson W. Clinical manifestation and treatment of gas poisoning JAMA 1977:69;70-7.

19- Lenonar R, Jonson LR. Gastrointestinal physiology, sixth edition, mosby, 2001. p.143-153.

20- Bloom and fawcett. A text book of histology, 12 Edition, chapman & Hall; 1996.p.620-631.

21- Graef I. The clinical pathologic effects of the nitrogen and sulfur mustard in jaboratory animals. AmJ pathol 1948;24: 1-17.

22- Canellt AF. Contributo alla conscenza dell imtossicaziona a cute yprit in particulare suo reporto anatomopatologico. Rivista os Peda. Itali 1918;8: 2-7.

23- Rovberts J. The metabolism of Mustard gas and related compounds. Biochem. Pharma 1968;12:1329-34.

24- Satu M and somani SM. Chemical warfare agents. Report Toxical 1993;10(4):17-56.