طب نظامی
بهار و تابستان ۱۳۷۹ شماره ۱۳ (۱ و ۲)
صفحات ۸۳-۷۹

بدست آوردن مدلی برای مهار سیستم ایمنی توسط سولفور موستارد

زهیر محمدحسن* Ph.D.، معصومه ابتکار* Ph.D.، علی پندونه** M.Sc.
* آدرس مکاتبه: دانشگاه تربیت مدرس ـ دانشکده علوم‌پزشکی ـ گروه ایمونولوژی ـ تهران ـ ایران
** دانشگاه علوم‌پزشکی بقیةالله(عج) ـ دانشکده پزشکی ـ گروه میکروبیولوژی

خلاصه

علیرغم تحقیقات گسترده انجام شده یک روش مؤثر برای درمان و بهبود افرادی که در معرض سولفورموستارد قرار گرفته‌اند بدست نیامده است. هنوز مهار شدید سیستم ایمنی علت اصلی ابتلاء مجروحین جنگی با سولفورموستارد به عفونتهای فرصت‌طلب سپتی‌سمی و حتی مرگ می‌باشد. در این گزارش ما یک مدل آلودگی سولفورموستارد در موش را ارائه می‌دهیم. حیوانات بصورت داخل صفاقی با سولفورموستارد آلوده شدند. این حیوانات علائم کلینیکی مشابه علائم کلینیکی مصدومین با سولفورموستارد در جنگ ایران و عراق را نشان دادند از جمله کم‌اشتهایی، اسهال، کاهش وزن و کوری.

اتوپسی حیوانات نشان‌دهنده نکروز شدید در روده و تحلیل طحال می‌باشد. نتایج بدست آمده مهار کلیه پاسخهای ایمنی در برابر sRBC اعم از تیتر آگلوتیناسیون و تست DTH را نشان می‌دهد.

مقدمه

سولفورموستارد یک مایع روغنی بی‌رنگ تا شفاف است. بیس ۲-کلروائتیل‌سولفید، ۱و۲دی‌کلروائتیل سولفید، بتادی‌کلروائتیل‌سولفید از دیگر نامهای سولفورموستارد می‌باشد. نقطه ذوب آن بین ۱۳ تا ۱۴ درجه سانتیگراد و نقطه جوش آن ۲۱۵ تا ۲۱۷ درجه سانتیگراد می‌باشد. سولفورموستارد به مقدار بسیار کم در آب حل می‌شود (۰/۶۸ گرم در لیتر در ۲۵ درجه سانتیگراد) ولی در چربی، حلالهای چربی و دیگر حلالهای مواد آلی به خوبی حل می‌شود. بر طبق گزارشهای موجود مجروحین با سولفورموستارد علائم کلینیکی زیر را نشان می‌دهند: ۱) اختلال در عملکرد ریه‌ها، خصوصاً در تبادل گازی در هنگامیکه ریه فاقد حرکات مکانیکی است. همچنین اختلال در مجاری هوایی فوقانی و تحتانی نیز گزارش شده است [۳،۲] ، ۲) دپیگمانتاسیون و زخمهای مرطوب پوست، تاول، بی‌رنگی و سیانوز خصوصاً در چروکیدگیهای پوست، ۳) عوارض چشمی، کنژنکتیویت، زخم قرنیه [۴] ، فوتوفوبی و تیرگی دید، ۴) اختلالات دستگاه گوارش: اشکال در بلع، حالت تهوع، استفراغ و اسهال، ۵) عوارض هماتولوژیک: افزایش تعداد لکوسیتها و متعاقب آن لکوپنی و تحلیل مغز استخوان [۵،۲] . در صورتیکه مغز استخوان کاملاً عملکرد خود را از دست دهد بیماری دارای سیر بسیار بدی خواهد بود.

مدلهای حیوانی متعددی برای بررسی اثر سولفورموستارد پیشنهاد شده است [۱۴] . تزریق دوزهای بالای سولفورموستارد به موش (۱۲۹/sv) باعث کاهش قابل ملاحظه‌ای در تعداد سلولهای طحال شده است. مطالعات

فلوسیتومتری نشان‌دهنده از بین رفتن اکثر سلولهای B نسبت به سلولهای T است. اما اختلال عمده‌ای در عملکرد سلولهای B باقیمانده مشاهده نمی‌شود.

علاوه بر این سولفورموستارد باعث مهار عملکرد سلولهای T نمی‌شوند [۱۲]. همچنین خوکچه‌های هندی تیره IAF (HA) DR (این تیره دارای تیموس و فاقد مو هستند) وقتی در معرض بخار سولفورموستارد قرار می‌گیرند تولید زخمهای پوستی "یک شکل" می‌کنند [۶]. سولفورموستارد بر روی پوست خرگوشهای نژاد نیوزیلند مالیده شد و مدیاتورهای التهابی در مراحل مختلف اندازه‌گیری گردید [۷]. مطالعات اثر سولفورموستارد بر تولید آنتی‌بادی به جنگ جهانی اول بر می‌گردد. در این مطالعات از خرگوش و سگ به عنوان مدلهای حیوانی و گلبولهای قرمز رت و گوسفند به عنوان آنتی‌ژن به کار رفت و اثر سولفورموستارد بر پرسیپیتین‌ها و همولیزین‌ها بررسی شد [۸].

در مطالعه حاضر بر آن بودیم تا یک مدل حیوانی در آلودگی با سولفورموستارد بدست آوریم، بطوریکه مشخصاً علائم کلینیکی مصدومین با این ماده را نشان دهد و از طرف دیگر آنقدر زنده بمانند تا آزمایشهای تولید آنتی‌بادی و ایمنی سلولی بر روی آنها انجام شود.

مواد و روشها

حیوانات. موشهای نر Balb/C با سن هشت تا ده هفته (انستیتو پاستور تهران) که در طول تحقیق آب استریلیزه و خوراک استاندارد اتوکلاو شده دریافت می‌کردند؛ خرگوش (انستیتو رازی تهران) و خوکچه هندی (انستیتو پاستور تهران).

سولفورموستارد (با خلوص ۹۹ درصد تعیین شده با گاز کروماتوگرافی) که با دقت تمام با بافر تیرودز (Tyrodes Buffer) رقیق و به حیوانات تزریق شد.

پاسخ آنتی‌بادی. پاسخهای آنتی‌بادی با تزریق 1×10^{9} sRBC بصورت داخل صفاقی در روز صفر سپس خونگیری از قلب در روز پنجم انجام شد. سرمها در چاهکهای میکروتیتر با بافر PBS دوبار رقیق شد. حجمهای ۳ درصد V/V sRBC شستشو شده به هر چاهک اضافه شد. پلت‌ها در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت انکوبه شد و سپس برای وجود هماگلوتیناسیون تست شدند. نتایج براساس لگاریتم ۲ ارائه شده‌اند [۹].

تست افزایش حساسیت نوع تأخیری (DTH). برای سنجش پاسخ DTH، 1×10^{8} گلبول قرمز گوسفندی بصورت زیر جلدی در پشت حیوان در روز صفر تزریق شد. به حیوانات حساس شده مجدداً 1×10^{8} sRBC در پشت پای چپ بصورت زیرجلدی تزریق شد. قطر پا پس از ۲۴ ساعت با کولیس ورنیه اندازه گرفته شد و نتایج بصورت درصد ارائه شد (Ebtekar, Hassan, 1993).

بررسی هیستولوژیک طحال. طحال جدا شده پس از کالبدشکافی حیوان در بافر فورمالین ۱۰ درصد نگهداری شده و برای بررسیهای هیستولوژیک آماده شد. از بافتها مقطع به قطر ۵ میکرومتر تهیه و با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شد.

روش آماری. از روش آماری T برای داده‌ها و از F-Test برای مقایسه میانگین‌ها استفاده شد. در تمامی آنالیزهای آماری سطح معنی‌دار ۵ درصد تعیین شد ($P<0/05$).

نتایج

مطالعات کلینیکی پس از تزریق سولفورموستارد. دوزهای مختلف سولفورموستارد به موش تزریق شد. دوزها به گونه‌ای تعیین شد که حیوانات حداقل برای ۶ روز زنده مانده و علائم مصدومیت با سولفورموستارد را نشان دهند (جدول ۱).

جدول ۱. علائم بالینی بعد از تزریق گاز خردل

Symptome	Routs of administration			
	I.P	Sc		
	Mice	Mice	Guinea pig	rabbit
Anorexia	+	+	+	–
Diarrhea	++	+	–	–
Blindness	++	–	–	–
Weight loss	++	+	–	–
Upon Atopsy:				
Necrosis of gut	++	–	–	–
Spleen degeneration	++	+	–	–
Local lesion	–	++	+	+

I.P,Intraperitoneal
Sc,Subcutaneous

متعاقب آلودگی با سولفورموستارد موشها علائم کلینیکی وسیعی را نشان دادند. میزان غذای مصرفی موشهای آلوده تقریباً ۵۰ درصد موشهای کنترل بود و مصرف آب نیز کاهش قابل ملاحظه‌ای را نشان داد. موشها از روز اول به بعد فعالیت بسیار کمی از خود نشان دادند و ترجیح می‌دادند در گوشه‌های قفس مستقر شوند. پوست ناهموار (به جای پوست نرم و صاف) شاخص خوبی برای وضعیت حیوانات بود.

کنژنکتیویت و کوری در روزهای ۳-۲ ظاهر شد به اینصورت که عدسی چشم حیوان نسبت به نور مستقیم واکنشی نشان نمی‌داد. اسهال نیز در طی همین چند روز به حیوان عارض شد. اغلب عوارض پاتولوژیک قابل ملاحظه‌ای که با اتوپسی مشخص شد شامل نکروز هموراژیک شدید در روده به همراه بزرگ شدن عروق مزانتریک بود. طحال نیز شدیداً آتروفی شده و رنگ آن از قرمز تیره به روشن و یا زرد تیره تغییر کرد.

بزرگ شدن کبد و گره‌های لنفاوی نیز به وفور در حیوانات آلوده مشاهده شد. قلب و کبد دچار تغییرات پاتولوژیک زیادی نشدند. جدول یک خصوصیات کلینیکی حیواناتی که از طریق داخل صفاقی و یا زیرجلدی با سولفورموستارد آلوده شدند نشان می‌دهد.

مرگ و میر پس از تزریق سولفورموستارد. در مورد مرگ و میر موشها نکته جالب توجه این بود که اگرچه تزریق سولفورموستارد براساس وزن حیوان انجام شد. حیوانات مسن‌تر با وزن بیشتر دوزهای بالای سولفورموستارد را به راحتی تحمل می‌کردند. حال آنکه حیوانات با وزن کمتر قادر به تحمل همان دوز یا پایین‌تر از آن را نداشتند. علت این تفاوت احتمالاً این واقعیت است که سولفورموستارد سریعاً توسط چربیها ذخیره شده و بتدریج در بدن آزاد می‌شود و لذا حیوانات با وزن بیشتر سولفور را بهتر تحمل می‌کردند. البته ممکن است این تفاوت بدلیل مراحل مختلف بلوغ حیوانات نیز باشد (جدول ۲).

براساس مشاهدات قبلی و تجربیات آزمایشی (Pilot Experiment) نتیجه گرفتیم که موشهای با وزن ۱۶ تا ۲۷ گرم دوزهای ۶/۳۵ µg/kg تا ۸/۹ µg/kg را می‌توانند تحمل کنند.

جدول ۲. داده‌های مرگ و میر بعد از تزریق گاز خردل

Dose U/kg	Rout inj.	weight Of mice	No. of mice	No. of survival on day 6	No. of dead	% Mortality rate
0	i.p.	14g		9	0	0
8.92	i.p.	16g	10	3	7	70
12.7	i.p.	18g	8	3	5	62.5
17.8	i.p.	23g	11	8	3	27.2
25.5	i.p.	26g	6	5	1	16.7
0	-	22g	7	7	0	0
6.35	i.p.	22g	18	8	10	55
0	-	22g	10	10	0	0
6.35	s.c.	22g	10	8	2	20

i.p. intraperitoneal
s.c. subcuaneous

این حیوانات علائم آلودگی با سولفورموستارد و مهار سیستم ایمنی نشان دادند.

دوز تزریقی سولفورموستارد در طول انجام تحقیق ۶/۳۵ µg/kg بود که مشاهدات بعدی معلوم کرد دوز مناسبی است. چون در تزریق داخل صفاقی سولفورموستارد میزان مرگ و میر حیوانات زیاد بود مرحله بعدی این مطالعه تعیین اثر سولفورموستارد با تزریق زیرجلدی (۶/۳۵ µg/kg) بر میزان مرگ و میر بود که نتایج در جدول ۲ آمده است و نشان‌دهنده کاهش میزان مرگ و میر بود. همچنین علائمی از آلودگی سولفورموستارد در حیوانات مشاهده نشد.

بررسیهای هیستولوژیک. برای تشخیص اثر سولفورموستارد بر پاسخهای ایمنی، پس از تزریق sRBC مطالعه هیستولوژیک طحال در هر دو گروه کنترل و آزمایش انجام شد. طحال گروه کنترل که فقط sRBC دریافت کرده بودند، یک افزایش حجم فولیکولهای لنفاوی (به میزان سه برابر) با افزایش مشخص مراکز ژرمینال و افزایش ماکروفاژهای فعال و هیستوسیتهای بزرگ نیز مشاهده شد.

تزریق داخل صفاقی سولفورموستارد کاهش تعداد و حجم فولیکولهای لنفاوی و کاهش مراکز ژرمینال فولیکولها را به دنبال داشت. در مواردی حذف Periarteriol Sheath نیز مشاهده شد. بعلت نکروز زیاد، فعالیت ماکروفاژها عمده‌ترین شاخص بود. اما در اغلب موارد فعال شدن ماکروفاژها کمتر از اندازه‌ای که از فقدان مراکز کمرنگ انتظار می‌رفت بود. آتروفی Mantle احتقان سینوزوئیدها نیز مشاهده شد.

مطالعات هیستولوژیکی روی طحال حیواناتی که سولفورموستارد را به صورت زیر جلدی دریافت کرده بودند نیز

انجام شد که مراکز ژرمینال بطور کامل از بین نرفته بودند و نکروزها هم نسبت به تزریق داخل صفاقی کاهش داشت.

بررسیهای ایمونولوژیک

پاسخ ایمنی هومورال . در این مرحله هدف معلوم کردن تأثیر یا عدم تأثیر سولفورموستارد بر سیستم ایمنی هومورال بود.بدین منظور گروههایی ۱۱ تایی حیوانات برای سنجش آنتی‌بادی انتخاب شدند. sRBC ^{8}۱×۱۰ و سولفورموستارد µg/kg ۶/۳۵ بصورت داخل صفاقی تزریق شد (جدول ۲). نتایج حاکی است که در مقایسه با گروه کنترل در گروههای آلوده شد با سولفورموستارد تولید آنتی‌بادی علیه sRBC بطور قابل ملاحظه‌ای کاهش داشتند ($P<0/05$).

پاسخ ایمنی سلولی (DTH) . معیار دیگر برای سنجش توان سیستم ایمنی تست واکنش افزایش حساسیت تأخیری (DTH) است که برای بررسی پاسخ ایمنی سلولی بکار می‌رود. برای سنجش DTH سولفورموستارد با دوز ثابت µg/kg ۶/۳۵ بصورت داخل صفاقی و sRBC ^{8}۱×۱۰ به صورت زیرپوستی در پشت حیوان تزریق شد. پنج روز بعد به حیوانات مجدداً آنتی‌ژن تزریق شد و یک روز بعد قطر پای چپ اندازه‌گیری شد.

نتایج کاهش معنی‌داری را در پاسخ DTH در گروه دریافت‌کننده سولفورموستارد نشان داد (جدول ۳). لذا می‌توان گفت سولفورموستارد مهار قابل ملاحظه‌ای در پاسخ ایمنی در این مدل موش ایجاد می‌کند.

جدول ۳. اثر گاز خردل بر روی پاسخ DTH به sRBC

Dose Ug/kg	Rout inj.	No. of Animals	Hemagg * liter	% of increase of foot pad thickness **
0		4		33.3
0		5	7	
6.35	i.p.	8		15-
6.35	s.c.	4		20.3
6.35	i.p.	5	5	

* hemagglutination (log)
** Kruskal_ wallis test

بحث

تاریخچه استفاده از سولفورموستارد به جنگ جهانی اول برمی‌گردد که باعث تلفات بسیاری شد. علیرغم تحقیقات گسترده مکانیزم دقیق پاتولوژیک سولفورموستارد در ایجاد اثرات سیتوتوکسیک و مهار ایمنی تعیین نشده است. همچنین یک روش درمانی مؤثر که باعث بهبود مصدومین با سولفورموستارد شده و یا میزان مرگ و میر بیماران را پایین بیاورد هنوز بدست نیامده است. هدف این مطالعه طراحی یک مدل آلودگی در موش بود. در این مطالعه چند موضوع مدنظر بوده است که شامل:

الف) اولین موضوع ایجاد علائم کلینیکی مشابه مجروحین سولفورموستارد در حیوان آزمایشگاهی بود. علامتی که در اغلب حیوانات پس از تزریق داخل صفاقی سولفورموستارد (با دوز مناسب) دیده شد کم‌اشتهایی، بیقراری، کوری و کاهش وزن بود. از طرف دیگر مقدار سولفورموستارد تزریقی به اندازه‌ای بود که حیوانات حداقل ۶ روز زنده بمانند. دوزهای مرگ‌آور برای انسان به خرگوش و خوکچه هندی تزریق شد و هیچگونه مرگ و میر در آنها مشاهده نشد و فقط التهاب موضعی ملاحظه گردید.

ب) دومین موضوع سن حیوانات بود که در این خصوص دقت زیادی شد چون دیده شده است بعضی از مواد شیمیایی وقتی که قبل از تولد و یا بعد از تولد (در حالیکه سیستم ایمنی در حال بلوغ است) تزریق شود، باعث تغییرات بیشتر سیستم ایمنی می‌شود [۱۳]. در حین این مطالعه سن حیوانات بین ۸ تا ۱۰ هفته بود (سنی که حیوان بالغ شده است).

زمانیکه sRBC بعنوان آنتی‌ژن بکار می‌رود سولفور-موستارد باعث کاهش قابل ملاحظه‌ای در پاسخ آنتی‌بادی و DTH می‌شود. اندکی وزن طحال کاهش پیداکرد و هیستولوژی بافت طحال کاهش زیادی در مراکز فولیکولی و نکروز وسیع در بافت را نشان داد. مشابه چنین تغییرات هیستولوژیک را Pappenheimer and Vance در مورد خرگوشهای در معرض سولفورموستارد گزارش کرده‌اند [۱۰].

از همه مهمتر شباهت مشاهدات هیستولوژیک این تحقیق با گزارشهایی است که از آتوپسی سربازان ایرانی در معرض گاز جنگی بدست آمده است [۱۱]. این گزارشها حاکی از کاهش قابل توجهی در گره‌های لنفاوی و نیز فقدان مراکز ژرمینال در فولیکولهای لنفاوی و کاهش لنفوسیتها می‌باشد. اجسام مالپیگی طحال نیز غیرمشخص بوده و مطابق یافته

D'Hallium [۱۱] حـاوی تـعداد انـدکی لنـفوسیت بـودند، شباهتهای زیادی که مابین گزارشهای هیستولوژیک داده شده از نمونه‌های انسانی و آنچه در این مطالعه در مدل حیوانی (موش) مشاهده شد موفقیت ما را در ارائه یک مدل حیوانی با عـلائم کلینیکی مشابه انسانی را نشان می‌دهد. امـا هـنوز بـایستی در مقایسه این داده‌ها بـا عـلائم کـلینیکی آلودگی بـا سـولفور- موستارد در انسان احتیاط لازم را انجام داد. علاوه بر ایـن لازم است مهار سیستم ایمنی و دیگر اثرات پاتولوژیک سولفور- موستارد نیز مطالعه شوند تا در کل براساس اطلاعات بـدست آمده بتوان یک راه درمانی را برای مصدومین با سولفورموستارد بدست آورد.

References

1. Pauser GA, Aloy et al. (1984). Lethal intoxicaton by war gases on Iranian soldiers. Proceeding of the Would Congress on Biological and Chemical Warfare, Toxicological Evaluation (ed. Heyndricks, A. pp.341-3351, Ghent University Press, Ghent.

2. Sohrapoar H (1987). Observations and clinical manifestations of patients injured with mustard gas. Medical of Islamic Republic of Iran Vol Nov, pp.32-37.

3. WHO (1970). Health aspect of chemical and Biological weapons. Report of WHO Group of Consultants, pp.29, WHO Geneva.

4. Markely K (1977). Effect of thermal trauma on number and function of T and B cells from mouse spleen. Int Archive of Allergy and Applied Immunology, Vol 54.

5. Supreme Defence Council, Islamic Republic of Iran (1983). Use of chemical warfare by Iraqi regime war information headquarters report 1983.

6. Mershon MM, Mitcheltree LW, Petrali JP, Braue EH, and Wade JV (1990). Hairless guinea pig bioassay model for vesicant vapor exposures. Fundamental and Applied Toxicology Vol 15, pp.622-31.

7. Dannenberg AR, Pula P, Louis H, Harada S, Tanaka F, Vogt RF, Kajiki A, and Higuch H (1985). Inflammatory mediators released in organ culure from rabbit skin lesions produced in vivo by Sulfur Mustard. 1- Quantitative histopathology; PMN, Basophil and Mommuclearcell Survival and Unbound (serum) Protein Content.

8. Hektoen L, and Corper HJ (1921). The effect of mustard gas on antibody formation. J of Infectious Disease Vol 28, 279.

9. Ebtekar M, and Hassan ZM (1993). Effect of Immunomodulators pyrimethamine and cimitidine on immunosupression induced by sulfur mustard in mice. Int J of Immunopharmacology Vol 15, NO 4.

10. Pappenheimer A, and Vance M (1919). The effects of intravenous injections of dichloroethyl sulfide in rabbits with special reference to its leucotoxic action. J of experimental Medicine Vol 31, pp.71.

11. D'Holluin F, and Roles H (1984). Autopsy observations in an Iranian soldier exposed to war gas. Proceeding of the First Would Congress on Biological and Chemical Warfare (ed. Heyndricks A.) University Press, pp.284-90, Ghent.

12. Coutelier, Lison D, Simon O, and Wellems (1991). The effect of sulfur mustard on murine lymphocytes. Toxicology Letter Vol 58, pp.143-48.

13. Dean J, et al. (1981). Assessment of Immunotoxicology induced by the environmental chemicals in advance in immunopharmacology (ed. JJ Hadden, Chedid L, Mullen P, and Spreafico F), pp.37, Pergamon Press, Oxford.

14. Maisonneuve A, Calleba I, Deborde L, and Coppet L (1993). Biological fate of sulphur mustard in rat: toxicokinetics and deposition.