

Study of the Effect of Sulfur Mustard on Cells Viability and DNA Fragmentation in the Human Skin Fibroblast Cells

Jafari M.¹ PhD, Pirzad G.^{*2} PhD, Zaree A.³ PhD, Saberi M.⁴ PhD

¹ Professor of biochemistry, Chemical Injuries Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Researcher of Physiology, Neuroscience Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Associate professor of biochemistry, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴ Professor of Pharmacology, Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Aims: Sulfur mustard (SM) is an alkylating and blistering agent that has readily reacts with a wide range of cellular macromolecules including DNA, RNA and protein. In this study, the effect of SM on cells viability and DNA fragmentation in the human fibroblastic cells was investigated.

Methods: the HF2FF human skin fibroblast cell line were exposed to various concentrations of SM (180-1000 μ M) and then incubated for 24 hours at standard condition. Then, the effect of SM was investigated by measuring percent of viable cells using gentian violet dye assays and DNA fragmentation by agarose gels electrophoresis and diphenylamine reaction.

Results: Viability of the cells exposure to 180, 300 and 300 μ M SM was 65, 42 and 16%, respectively. DNA fragmentation was increased and represented a smear pattern on agarose gel electrophoresis after exposure to higher concentrations of SM (>180 μ M).

Conclusion: The effect of SM on viability and DNA damage is dose- dependent. At higher of SM concentrations (>180 μ M), SM alkylates DNA, leading to DNA strand breaks and the nature of the DNA fragments produced suggested that necrotic form of cell death.

Keywords: Sulfur Mustard, HF2FF Cell line, Viability, DNA Fragmentation

بررسی اثر خردل گوگردی بر روی بقای سلولی و شکست DNA در سلول‌های فیبروبلاست پوست انسان

مهوش جعفری^۱ PhD، ژیلا پیرزاد^{۲*} PhD، علی زارعی^۳ PhD، مهدی صابری^۴ PhD

^۱مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله(عج)، تهران، ایران
^۲مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله(عج)، تهران، ایران
^۳گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله(عج)، تهران، ایران
^۴گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله(عج)، تهران، ایران

چکیده

اهداف: خردل گوگردی از عوامل آلکیله کننده تاول زا است که به آسانی با طیف وسیعی از ماکرو مولکول‌های سلولی مانند DNA، RNA و پروتئین‌ها واکنش می‌دهد. در این مطالعه، اثر خردل بر روی بقای سلولی و قطعه‌قطعه شدن DNA در سلول‌های فیبروبلاست انسان بررسی شده است.

روش‌ها: سلول‌های فیبروبلاست پوست انسان رده سلولی HF2FF تحت تأثیر غلظت‌های مختلف خردل ($1000-180 \mu\text{M}$) قرار گرفت و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط استاندارد اینکوبه شد. سپس اثر خردل روی درصد بقای سلولی با استفاده از رنگ‌آمیزی ویوله ژانسیان و شکست DNA با روش‌های ژل الکتروفورز آگاروز و واکنش دی فنیل آمین بررسی شد.

یافته‌ها: بقای سلول‌هایی که تحت تأثیر غلظت‌های ۱۸۰، ۳۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار خردل قرار گرفتند به ترتیب ۶۵، ۴۲ و ۱۶ درصد بود. شکست DNA در غلظت‌های بالاتر خردل ($> 180 \mu\text{M}$) افزایش و به صورت اسمیر بر روی ژل آگاروز نمایان شد.

نتیجه گیری: اثر خردل گوگردی روی بقای سلولی و شکست DNA وابسته به غلظت است. در غلظت‌های بالاتر خردل ($> 180 \mu\text{M}$)، آلکیلاسیون DNA منجر به شکست DNA می‌شود که الگوی قطعات DNA روی ژل آگاروز نشان دهنده مرگ سلولی از نوع نکروز است.

کلیدواژه‌ها: خردل گوگردی، رده سلولی HF2FF، بقای سلولی، قطعه‌قطعه شدن DNA

مقدمه

خردل گوگردی (دی کلرواتیل سولفید) یک عامل آلکیل کننده بسیار قوی و غیراختصاصی است که می‌تواند اثرات بسیار مخربی بر روی بافت‌های مختلف موجودات زنده بگذارد. این عامل به‌عنوان سلاح شیمیایی بارها در جنگ‌های مختلف به‌ویژه در جنگ تحمیلی ۸ ساله عراق علیه ایران به‌دفعات توسط نیروهای عراقی مورد استفاده قرار گرفت که اثرات جبران ناپذیری را بر جای گذاشت [۱-۳]. بیشتر از ۱۰۰،۰۰۰ نفر از مصدومین آلوده به این عامل از عوارض دیررس گاز خردل رنج می‌برند [۴].

پوست یکی از مسیرهای اصلی ورود خردل به بدن است که در اثر تماس با آن ایجاد تاول‌های شدیدی می‌نماید. خردل گوگردی به‌صورت مایع یا بخار در چربی حل می‌شود و از طریق پوست جذب می‌گردد. ۸۰ درصد خردل گوگردی مایع که به روی پوست ریخته می‌شود، تبخیر می‌گردد. از مقداری که به پوست نفوذ می‌کند، تنها ۱۰ درصد در پوست باقی مانده و بقیه آن به‌صورت سیستمیک جذب می‌شود. خردل قادر است در بدن با گلوپروتئین واکنش دهد و به‌صورت غیر متابولیزه برای مدت طولانی در چربی بدن ذخیره شود. در بدن خردل با حلقوی شدن به یک مرکز الکتروفیل به نام اتیلن سولفونیوم تبدیل می‌شود که قادر است با مراکز نوکلئوفیل پروتئین‌ها و DNA واکنش دهد و عمل طبیعی این ماکرومولکول‌ها را تحت تأثیر قرار دهد [۵-۷].

اگرچه اثرات خردل گوگردی به‌عنوان سلاح شیمیایی به‌خوبی شناخته شده است، اما هنوز مکانیسم بیوشیمیایی آن دقیقاً روشن نشده است. مهم‌ترین هدف مولکولی خردل DNA است که به‌طور ترجیحی نیتروژن را در موقعیت ۷ در گوانین و ۱ در آدنین در بازهای پورین و پیریمیدین آزاد، نوکلئوزیدها و نوکلئوتیدها آلکیل می‌نماید. همچنین خردل گوگردی قادر است به دو نیتروژن در موقعیت ۷- گوانین در یک رشته و یا دو رشته‌ی مختلف DNA متصل شود و پیوندهای عرضی (Cross-Links) ایجاد نماید و در نتیجه مانع از جدا شدن دو رشته‌ی DNA و مهار همانند سازی DNA گردد که در نهایت منجر به توقف سیکل سلولی و شکست در DNA تک رشته‌ای و دو رشته‌ای شود [۸-۱۰]. همچنین خردل با افزایش حلالیت هیستون‌های H₃ و H₂B باعث افزایش قطعه‌قطعه شدن DNA می‌شود و به همین دلیل خردل دارای خواص موتازنی و سرطان‌زایی است [۲، ۱۱]. آلکیلاسیون رشته DNA و شکست در زنجیره DNA توسط خردل باعث فعال شدن آنزیم هسته‌ای بنام PARP یا پلی ADP-ریبوزیل پلیمرز برای ترمیم DNA می‌گردد. این آنزیم با استفاده از سوبسترای NAD⁺ (نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید)، پلیمرهای طولی و شاخه دار پلی (ADP-ریبوز) را به محل شکست متصل می‌کند، ترمیم DNA بعد از جدا شدن PARP از زنجیره DNA آغاز می‌شود، فعالیت بیش از حد این آنزیم منجر به تخلیه ذخایر سلولی NAD⁺ می‌شود که کوفاکتور سوبسترای مهم مسیر گلیکولیز است. با مهار گلیکولیز

میزان گلوکز ۶- فسفات افزایش می‌یابد که وارد مسیر پنتوز فسفات می‌شود. این مسیر باعث فعال شدن پروتئازهای سلولی شده که در نهایت منجر به مرگ سلولی می‌شود [۸، ۱۲].

با توجه به اینکه اثرات خردل گوگردی در بافت‌ها مختلف است و نحوه بند و بست خردل به DNA و مکانیسم‌های القاء شکست DNA در بافت‌ها متفاوت می‌باشد [۱۳]؛ باید این تفاوت‌ها با روش‌های مختلف بررسی شوند تا عملکرد و مکانیسم عمل این عامل بهتر درک شده تا در جهت شناسایی روش‌های تشخیص آلودگی به این عامل و یافتن روش‌های درمانی مناسب برای جلوگیری از ایجاد ضایعات استفاده شود. پوست یکی از مهم‌ترین بافت‌های هدف خردل بوده و نقش آن در محافظت از بدن و آلودگی سریع آن در مواجهه با مواد و سموم، آسیب‌پذیری آن به‌ویژه در تماس با خردل بسیار شدید و وسیع می‌باشد. به علت طبیعت کارسینوژن خردل و نیز عوارض ماندگار و خطرناک این ماده، استفاده از داوطلبان انسانی برای مطالعه مقدر نیست، لیکن کشت سلول‌های پوست از جمله فیبروبلاست‌ها که در مواجهه با خردل نقش بسیار مهمی دارد، مدل بسیار مناسبی برای بررسی است [۱۴]. با توجه به مشکلات کشت بافت پوست و عدم دقت کافی در تهیه برش نمونه‌های پوست به‌منظور تسهیل ارزیابی اثرات خردل از یک مدل *in vitro* از سلول‌های HF2FF نوع فیبروبلاست پوست انسان تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. هدف از این مطالعه، بررسی اثر غلظت‌های مختلف خردل گوگردی بر روی در صد بقای سلولی و شکست DNA سلول‌های فیبروبلاست پوست انسانی رده HF2FF است.

روش‌ها

مواد شیمیایی: سلول‌های فیبروبلاست پوست انسان رده سلولی HF2FF (NO.NCBI-C190) از انستیتو پاستور (تهران، ایران)، محیط‌های کشت RPMI و HBSS از شرکت ICN Biomedical و FCS (Fetal Calf Serum) از شرکت Biochrom آلمان خریداری شدند. محیط کشت RPMI شامل ۱۰٪ FCS، پنی‌سیلین و استرپتومایسین هر کدام ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر و بی‌کربنات سدیم ۲ گرم بر لیتر ۷/۴ pH تهیه گردید و سپس با فیلترهای میلی پور ۰/۴۵μm استریل و در ۴°C نگهداری شد. خردل گوگردی با خلوص ۹۹ درصد با مایع ذخیره با غلظت ۴۰ میلی‌مولار گاز خردل در پروپان دیول بلافاصله قبل از مصرف تهیه گردید. کلیه مواد شیمیایی دیگر با درجه‌ی خلوص بالا بوده و از کارخانه‌های سیگما (Sigma) یا مرک (Merck) خریداری شدند.

کشت سلولی: در این مطالعه تجربی، رده سلولی HF2FF در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰٪ FCS در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO₂ و ۹۵٪ هوای مرطوب در فلاکس‌های ۵۰ml کشت داده شدند. این سلول‌ها پس از رشد در فاز لگاریتمی

به‌خوبی مخلوط شد و به مدت یک شب در 37°C قرار گرفتند (پس از انکوباسیون هم حجم نمونه، محلول فل-کلروفرم-ایزوامیل الکل (با نسبت ۲۵:۲۴:۱) اضافه و کاملاً مخلوط شد. آنگاه به مدت ۱۰ دقیقه در 4°C با دور ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ گردید و فاز رویی (مایه) به‌دقت جدا شد. این عمل یک بار دیگر انجام گرفت. مجدداً به فاز رویی محلول کلروفرم-ایزوامیل الکل (۲۴:۱) اضافه شد و بعد از مخلوط کردن سانتریفوژ شد. سپس فاز رویی را جدا کرده و ۱/۰ حجم محلول استات سدیم ۳ مولار $\text{pH}=5/5$ و دو حجم اتانول مطلق سرد افزوده و پس از مخلوط کردن یک شب در 20°C قرار گرفت. نمونه‌ها در ۱۰۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه در 4°C سانتریفوژ شد و رسوب با اتانول ۷۰ درصد شستشو و پس از سانتریفوژ کردن، الکل رویی به‌دقت خارج گردید و نمونه‌ها خشک شد. نمونه‌های DNA در بافر TBE (۹۰ میلی مولار تریس HCl، ۲ میلی مولار EDTA و ۹۰ میلی مولار اسید بوریک ۸ $\text{pH}=$ حل گردید و آماده برای الکتروفورز شدند [۱۷].

ژل الکتروفورز DNA: ژل الکتروفورز افقی با ژل آگاروز ۱/۲٪ در بافر TBE تهیه شد. پس از حل کردن نمونه‌های DNA در بافر TBE به آن‌ها بافر حلال نمونه (۴۰ درصد گلیسرول، ۰/۲۵ درصد برموفنل بلو و ۰/۲۵ درصد گزین سیانول در بافر TBE) اضافه شد. بعد از قرار دادن نمونه‌ها بر روی ژل به مدت ۴ ساعت با ولتاژ ۶۰، الکتروفورز گردید. آنگاه با رنگ اتیدیوم بروماید، رنگ آمیزی و در زیر نور U.V مورد بررسی و عکس‌برداری قرار گرفت. **محاسبات آماری:** با استفاده از آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و Tukey نتایج مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و به‌صورت $\text{Mean}\pm\text{SD}$ بیان شد. نتایج با $p<0/05$ معنی‌دار لحاظ گردید.

یافته‌ها

شکل ۱ درصد بقای سلولی سلول‌های فیروبلاست رده سلولی HF2FF را بعد از ۲۴ ساعت کشت در حضور و عدم حضور غلظت‌های مختلف خردل نشان می‌دهد که با افزایش غلظت خردل میزان بقای سلولی کاهش می‌یابد. بیشترین اثر مخرب خردل بر سلول‌های HF2FF در دوزهای بالاتر از ۱۸۰ میکرومولار مشاهده می‌گردد. بقای سلول‌هایی که تحت تأثیر غلظت‌های ۳۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار خردل قرار گرفته‌اند به ترتیب ۴۲/۱۷۸ و ۱۶/۸۵۴ درصد می‌باشد.

نتایج حاصل از استخراج DNA بر روی ژل آگاروز در شکل ۲ نشان می‌دهد که هر چه غلظت خردل بیشتر می‌شود حرکت آن روی ژل سریع‌تر گشته و قطعات DNA کوچک‌تر می‌شود. DNA استخراج شده از سلول‌هایی که تحت تأثیر غلظت‌های ۳۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار گاز خردل قرار گرفته‌اند، به‌صورت اسمیر (smear) بر روی ژل آگاروز نمایان می‌شود.

تعیین درصد قطعه‌قطعه شدن DNA سلول‌های HF2FF در معرض غلظت‌های مختلف خردل بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون با

با تریپسین جدا شده و در پلیت‌های ۹۶ تایی با تراکم 5×10^4 سلول قرار گرفته و به مدت ۲۴ ساعت برای چسبیدن سلول در همین حال باقی ماندند. سپس محیط کشت RPMI از حفره‌ها تخلیه و ۲۰۰ میکرولیتر محلول HBSS حاوی غلظت‌های مختلف خردل (۰، ۱۸۰، ۳۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار) جایگزین شد. سلول‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد و $5\% \text{CO}_2$ و $95\% \text{HO}_2$ مرطوب اینکوبه شده، سپس با ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت RPMI جایگزین و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط فوق قرار گرفت. **تعیین درصد بقای سلولی:** میزان درصد بقای سلولی نمونه‌ها ($n=24$) با روش کریستال ویوله ژانسیان (GV) تعیین گردید. پس از حذف محیط کشت بعد از ۲۴ ساعت کشت، سلول‌ها چند بار با محلول HBSS شسته شد و با فرمالدئید ۴٪ در بافر فسفات سالین به مدت ۲۰ دقیقه در 20°C فیکس گردید. پس از فیکس نمودن و خارج کردن محلول فیکس کننده، سلول‌ها با کریستال ویوله ۰/۱٪ به مدت ۳۰ دقیقه رنگ آمیزی شده و با آب شستشو داده شد. به‌منظور محلول کردن رنگ متصل به سلول از تریتون ۱۰۰-۱ X ۰/۲٪ استفاده گردید و پس از یک ساعت انکوباسیون و ۵ دقیقه شیک کردن جذب رنگ محلول در مقابل محلول بلانگ در ۵۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد [۱۵].

اندازه‌گیری قطعه‌قطعه شدن DNA: پس از اتمام زمان انکوباسیون، سلول‌های فیروبلاست رده سلولی HF2FF در حضور و عدم حضور غلظت‌های مختلف خردل ($n=5$) در ۲۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در 4°C سانتریفوژ شد و ۰/۵ میلی لیتر بافر لیز سلولی (۱۰ میلی مولار تریس HCl، یک میلی مولار EDTA $\text{pH}=8$ و $0/2\% \text{ Triton}-100$) به رسوب اضافه گردید و پس از مخلوط کردن در ۱۵۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه در 4°C سانتریفوژ گردید. ۰/۵ میلی لیتر از بافر لیز سلولی به رسوب اضافه شد. سپس به رسوب (P) و محلول رویی (S) ۰/۵ میلی لیتر TCA ۲۵٪ اضافه شد و یک شب در دمای 4°C قرار داده شد و بعد از سانتریفوژ در ۱۵۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه در 4°C ، روی رسوب لوله‌های P و S، ۸۰ میکرولیتر TCA ۵٪ اضافه شد و در 83°C به مدت ۲۰ دقیقه آنکوبه شد. سپس به هر نمونه ۱۶۰ میکرولیتر معرف دی فنیل آمین (۱۵۰ mg/mL) دی فنیل‌آمین در ۱۰ میلی لیتر اسید استیک، ۱۵۰ میکرولیتر اسید سولفوریک، ۵۰ میکرولیتر استالدئید ۱۶ mg/mL اضافه شد و برای ۲۴ ساعت در درجه حرارت اتاق آنکوبه شد و جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و درصد قطعه‌قطعه شدن DNA محاسبه گردید [۱۶].

$$\% \text{ Fragmented DNA} = \frac{\text{OD (S)}}{\text{OD (S)} + \text{OD (P)}} \times 100$$

استخراج DNA: پس از اتمام زمان انکوباسیون، ۰/۵ میلی لیتر بافر لیز سلولی (تریس HCl ۱۰ میلی مولار، NaCl ۰/۱ میلی مولار، EDTA یک میلی مولار در $\text{pH}=8$ ، SDS یک درصد و ۰/۲ mg/ml پروتئیناز K) به سلول‌های فیروبلاست رده سلولی HF2FF در گروه کنترل و گروه‌های تیمار شده با خردل اضافه و

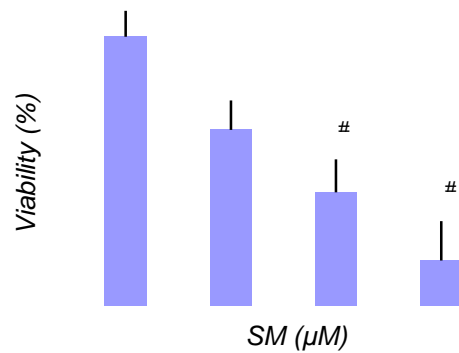
واکنش دی فنیل آمین در شکل ۳ نشان می‌دهد که درصد قطعه‌قطعه شدن DNA با افزایش غلظت خردل در مقایسه با کنترل افزایش می‌یابد (کنترل ۱۱٪). درصد قطعه‌قطعه شدن DNA در غلظت‌های ۱۸۰، ۳۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار گاز خردل به ترتیب برابر ۱۴/۲۴۷، ۱۶/۳۸ و ۲۲/۷۴ درصد است.

بحث

نحوه اتصال خردل به DNA و مکانیسم‌های القاء شکست DNA در بافت‌های مختلف متفاوت است، به طوری که هنوز مطالعات در این زمینه ادامه دارد [۱۳، ۱۸، ۱۹]. مطالعه با سلول‌های HF2FF نشان داد این سلول‌ها به‌عنوان مدلی از سلول‌های پوستی انسانی برای ارزیابی اثرات خردل مدل بسیار مناسبی 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 نیز 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 [۱۴]. Kehe و همکاران از مدل پوست کاملاً کلفت به‌صورت *in vitro* (FTSM) جهت بررسی اثر خردل بر بیان ژن‌های مرتبط با التهاب در فیبروبلاست‌ها و کراتینوسیت‌ها استفاده کردند [۲۰].

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که با افزایش غلظت خردل میزان بقای سلولی کاهش می‌یابد، به طوری که در غلظت‌های ۳۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار به ترتیب ۴۲ و ۱۷ درصد سلول‌ها زنده هستند. مطالعات نشان داده‌اند که بقای سلول‌ها تا ۹ ساعت با غلظت ۳۰۰ میکرومولار خردل [۲۱] و ۸ ساعت با غلظت ۱۰۰ میکرومولار ۲- کلرواتیل اتیل سولفید (CEES) از مشتقات تک بازویی خردل گوگردی حفظ می‌شود [۲۲]. به همین دلیل اثرات مهارکننده‌های PARP مثل ۳- آمینو بنز آمید و غلظت‌های بالای نیکوتین آمید (۱-۱۰ μM) در غلظت‌های بالای خردل که مانع تخلیه NAD^+ ، کاهش ATP و مرگ سلولی می‌شود، زمانی مشاهده می‌شود که در طی ۸ ساعت اول بعد از تماس با خردل اضافه شود، البته می‌تواند بعضی از مسیرهای متابولیکی را حفظ کند، حتی اگر پس از ۸ ساعت اول بعد از تماس با خردل اضافه شود [۲۲-۲۴]. Detheux و همکاران نشان دادند که بقای سلول‌های کشت شده فیبروبلاست‌های 3T3، ۲۴ ساعت بعد از تماس با غلظت ۱۰۰ میکرومولار خردل معنی دار نیست، ولیکن سنتز پروتئین کاهش می‌یابد [۲۵]. همچنین مطالعات نشان می‌دهد که در طی مرگ سلولی از نوع آپوپتوزیس بقای سلولی حفظ و سلول از نظر متابولیکی فعال است، در حالی که در حالت نکروز سلول‌ها غیرفعال و بقای سلولی به‌شدت کاهش می‌یابد [۲۶].

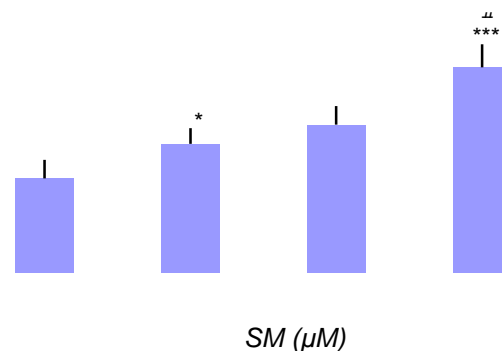
باوجود مطالعات بسیار، مکانیسم دقیق ایجاد ضایعات ناشی از خردل شناخته نشده است، به همین دلیل امکان مقابله سریع و



شکل ۱. اثر غلظت‌های مختلف خردل گوگردی بر میزان سلول‌های زنده تعیین شده با استفاده از رنگ آمیزی GV بعد از ۲۴ ساعت کشت (n=۲۴). $p < 0.001$ *** در مقایسه با کنترل معنی دار است. # در مقابل غلظت‌های کمتر گاز خردل با $p < 0.05$ معنی دار است.



شکل ۲. طرح الکتروفورز ژل آگاروز ۱/۲ در صد DNA استخراجی از سلول‌های فیبروبلاست در حضور و عدم حضور غلظت‌های مختلف خردل گوگردی بعد از ۲۴ ساعت. شماره‌های ۱ الی ۴ به ترتیب کنترل، ۱۸۰، ۳۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار خردل.



شکل ۳. اثر غلظت‌های مختلف خردل گوگردی بر میزان قطعه‌قطعه شدن DNA بعد از ۲۴ ساعت کشت (n=۵). $p < 0.05$ *, $p < 0.001$ *** در مقایسه با کنترل معنی دار است. # $p < 0.05$ در مقابل غلظت‌های کمتر گاز خردل معنی دار است.

می‌شود که یکی از آن‌ها افزایش فعالیت آندونوکلئازها است که باعث شکست DNA می‌شود که منجر به فشرده شدن کروماتین و فعال شدن PARP و تخلیه NAD^+ و انرژی می‌شود که در نهایت مرگ سلولی از نوع آپوپتوزیس و نکروز را القاء می‌کند [۲، ۲۳، ۳۴]. اینتوری و همکاران نشان دادند که تماس سلول‌های اپیدرمال JB6 و فیبروبلاست‌های پوست با CEES باعث القاء استرس اکسیداتیو و آسیب اکسیداتیو DNA می‌شود و پیش‌درمانی این سلول‌ها با گلوکاتینون از میزان این آسیب‌ها می‌کاهد [۲۹]. چندین مطالعه اثر چندین فاکتور نظیر PARP، سیتوکین‌ها و فاکتورهای القا کننده آپوپتوزیس را در آسیب‌های ناشی از خردل گوگردی در فیبروبلاست‌ها و کراتینوسیت‌ها بررسی کرده‌اند [۲۶، ۳۵، ۳۶]. بسیاری از مطالعات نشان می‌دهند که خردل در غلظت‌های کمتر از ۳۰۰ میکرومولار و یا در زمان‌های کوتاه‌تر باعث آپوپتوزیس می‌شود، در حالی که در غلظت‌های بالاتر از ۳۰۰ میکرومولار و یا زمان‌های طولانی‌تر نکروز را در سلول‌ها القاء می‌کند [۲۱، ۲۵]. میکائیلسون و همکاران نشان دادند که الگوی قطعه‌قطعه شدن DNA ای بافت‌های تیموس کشت شده با غلظت ۵۰ میکرومولار خردل بعد از ۲۴ ساعت در محیط کشت مشابه آپوپتوزیس است و در غلظت‌های بالاتر از ۵۰۰ میکرومولار، تجزیه ژنومی به قطعات بسیار کوچک بیشتر می‌گردد [۳۷]. مطالعه روی کراتینوسیت‌های کشت شده نشان می‌دهد که با غلظت ۱۰۰ میکرومولار خردل قطعات الیگونوکلئوزومی DNA ظاهر نمی‌شود، در حالی که در غلظت ۳۰۰ میکرومولار این قطعات مشاهده می‌شود [۳۸]. قطعه‌قطعه شدن DNA در بافت لنفوسیت بعد از ۲ ساعت، با غلظت 3×10^{-4} مولار و بعد از ۲۴ ساعت، با غلظت 6×10^{-6} مولار خردل دیده می‌شود و هر چه زمان تماس با خردل بیشتر می‌گردد، شکست DNA در مرگ سلولی آپوپتوزیس به‌صورت الگوی نردبانی (Ladder) به فرم شکست نامنظم DNA (اسمیر) در مرگ سلولی نکروز تغییر می‌کند [۲۳]. یک مطالعه در آزمایشگاه ما نشان داد که خردل در غلظت‌های کمتر از ۵۰۰ میکرومولار باعث باز شدگی DNA و آزاد شدن پروتئین‌های هیستونی می‌شود، در حالی که در غلظت‌های بالاتر از ۵۰۰ میکرومولار احتمالاً با تولید پیوند عرضی بین DNA-پروتئین یا پروتئین-پروتئین باعث فشردگی و رسوب کروماتین و در نهایت مهار سنتز DNA می‌گردد [۳۹]. میلارد و همکاران نشان دادند که خردل با افزایش حلالیت هیستون‌های H_2B و H_3 باعث قطعه‌قطعه شدن شدید DNA می‌شود [۱۱].

نتیجه گیری

نتایج نشان داد که اثر خردل گوگردی روی بقای سلولی و شکست DNA وابسته به غلظت است. خردل با آلکیلاسیون DNA منجر به شکست DNA می‌شود که با توجه به نوع الگوی قطعات DNA روی ژل آگاروز پیشنهاد می‌شود که سلول‌ها در حضور

مؤثر بر علیه این عامل وجود ندارد و در اغلب موارد ضایعات ناشی از خردل به‌صورت علامتی درمان می‌شود [۲۷]. چندین نظریه برای اثرات سمی خردل پیشنهاد شده است: (۱) شکست DNA و فعال شدن آنزیم PARP؛ (۲) تخلیه گلوکاتینون و پراکسیداسیون لیپیدهای سلولی که منجر به استرس اکسیداتیو می‌شود؛ (۳) تخلیه گلوکاتینون و غیرفعال شدن آنزیم‌هایی که در تنظیم هموستاز کلسیم شرکت دارند و (۴) ناپایداری لیزوزوم‌ها که آزاد شدن آنزیم‌های هیدرولیزکننده (سیستئین پروتئاز و فسفولیپاز) را به داخل سیتوپلاسم تحریک می‌کنند و افزایش فعالیت فسفولیپاز باعث تجزیه فسفولیپیدهای غشاء سلولی گردیده که منجر به آزاد شدن اسید آراشیدونیک از غشاء سلولی می‌شود [۲، ۸، ۲۸-۳۰]. تحقیقات جدید بیشتر روی نظریه اول متمرکز شده است و احتمالاً قادر است سمیت سلولی، تاول‌زایی و مرگ سلولی ناشی از خردل را توجیه کند [۲].

DNA مهم‌ترین هدف مولکولی خردل است. این عامل در pH فیزیولوژیکی باعث آلکیلاسیون بازهای پورین و پیریمیدین و ایجاد پیوندهای عرضی بین رشته‌ای و داخل رشته‌ای می‌شود که باعث مهار سنتز DNA و تقسیم سلولی می‌گردد [۹، ۱۰]. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که شکست DNA ناشی از خردل وابسته به غلظت خردل است و در غلظت‌های ۳۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار خردل به‌صورت اسمیر روی ژل آگاروز رؤیت می‌شود که نشان دهنده شکست نامنظم DNA و آسیب شدید به DNA است و در حالت مرگ سلولی از نوع نکروز دیده می‌شود. اندازه‌گیری کمی قطعه‌قطعه شدن DNA به روش دی فنیل آمین نتایج ژل الکتروفورز آگاروز را تأیید می‌کند. قطعه‌قطعه شدن DNA ناشی از گاز خردل می‌تواند به چند دلیل باشد: (۱) آلکیلاسیون DNA و ایجاد پیوندهای عرضی که مانع تشکیل DNA ای سوپر کویل می‌شود؛ (۲) افزایش فعالیت آنزیم‌های نوکلئاز برای ترمیم DNA و (۳) اختلال در اتصال هیستون‌ها به DNA و آزاد شدن DNA از کروماتین [۱۱، ۲۳]. یک مطالعه نشان داد که خردل باعث شکست‌های دو رشته‌ای در مدل پوست موش سوری می‌شود [۳۱]. همچنین تماس خردل با لنفوسیت‌ها و کراتینوسیت‌های انسان باعث آسیب DNA می‌شود که با روش comet در مطالعات *in vitro* نشان داده شده است [۳۲، ۳۳]. بهروان و همکاران با مطالعه روی شکست DNA در مصدومین شیمیایی نشان دادند که میزان آسیب به DNA لنفوسیت‌ها با روش comet در بیماران آلوده با خردل بالاتر از افراد کنترل می‌باشد [۴].

از مکانیسم‌های دیگر که منجر به آسیب DNA می‌شود، نظریه تیول- Ca^{2+} است که شروع سمیت خردل همراه با کاهش گلوکاتینون بوده که با مهار Ca^{2+} ترانس‌لوکاز باعث افزایش کلسیم داخل سلولی می‌شود (افزایش غلظت کلسیم سیتوزول منجر به فعال شدن یکسری فرآیندهای کاتابولیکی وابسته به Ca^{2+}

تحقیقات آسیب‌های شیمیایی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) در قالب طرح تحقیقاتی انجام گردیده است که بدین وسیله نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولین آن مرکز ابراز می‌دارند.

منابع

- Kehe K, Thiermann H, Balszuweit F, Eyer F, Steinritz D, Zilker T. Acute effects of sulfur mustard injury-Munich experiences. *Toxicology*. 2009;263(1):3-8.
- Papirmeister B, Feister AJ, Robinson SI, Ford RD. Medical defense against mustard gas: toxic mechanisms and pharmacological implications. 1st ed. Boca Raton (FL): CRC Press; 1991. 359 p.
- Marrs TC, Maynard RL, Sidell FR. Chemical warfare agents: toxicology and treatment. Chichester (England): Wiley; 1996. Chapter 6, Mustard gas; p. 139-173.
- Behravan E, Moallem SA, Khateri S, Maraghi E, Jowsey P, Blain PG, et al. Deoxyribonucleic acid damage in Iranian veterans 25 years after wartime exposure to sulfur mustard. *J Res Med Sci*. 2013;18(3):239-44.
- Lomash V, Jadhav SE, Vijayaraghavan R, Pant SC. Time course pathogenesis of sulphur mustard-induced skin lesions in mouse model. *Int Wound J*. 2013;10(4):441-54.
- Rice P. Sulphur mustard injuries of the skin. *Pathophysiology and management*. *Toxicol Rev*. 2003;22(2):111-8.
- Jafari M, Ghanei M. Evaluation of plasma, erythrocytes, and bronchoalveolar lavage fluid antioxidant defense system in sulfur mustard-injured patients. *Clin Toxicol (Phila)*. 2010;48:184-92.
- Kehe K, Balszuweit F, Steinritz D, Thiermann H. Molecular toxicology of sulfur mustard-induced cutaneous inflammation and blistering. *Toxicology*. 2009;263(1):12-9.
- Debiak M, Panas A, Steinritz D, Kehe K, Burkle A. High-throughput analysis of DNA interstrand crosslinks in human peripheral blood mononuclear cells by automated reverse FADU assay. *Toxicology*. 2011;280(1-2):53-60.
- Jowsey PA, Williams FM, Blain PG. DNA damage responses in cells exposed to sulphur mustard. *Toxicol Lett*. 2012;209(1):1-10.
- Millard CB, Meier HL, Broomfield CA. Exposure of human lymphocytes to bis-(2-chloroethyl)sulfide solubilizes truncated and intact core histones. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1224(3):389-94.
- Meier HL, Gross CL, Papirmeister B. 2,2'-Dichlorodiethyl sulfide (sulfur mustard) decreases NAD⁺ levels in human leukocytes. *Toxicol Lett*. 1987;39(1):109-22.
- Rao P, Vijayaraghavan R, Bhaskar A. Sulphur mustard induced DNA damage in mice after dermal and inhalation exposure. *Toxicology*. 1999;139:39-51.
- Saberi M, Zarei A, Pirzad J, Golmanesh L, Imani H, Pourheidarizadeh G, et al. Assessment of the protective effect of hexamethylene tetramin on

غلظت‌های کمتر از $300 \mu\text{M}$ به طرف مرگ سلولی از نوع آپوپتوزیس پیش می‌روند، در حالی که در غلظت‌های بالاتر از $300 \mu\text{M}$ مرگ سلولی از نوع نکروز القا می‌شود.
تشکر و قدردانی: این تحقیق با استفاده از حمایت مالی مرکز

- HF2FF cell line exposed to sulfur mustard. *J Mil Med*. 2006;7:271-7.
- Griffiths GD, Lindsay CD, Upshall DG. Examination of the toxicity of several protein toxins of plant origin using bovine pulmonary endothelial cells. *Toxicology*. 1994;90(1-2):11-27.
- Burton K. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem J*. 1956;62(2):315-23.
- Garner I. Isolation of High-Molecular-Weight DNA from animal cells. In: Rapley R, editor. *The nucleic acid protocols handbook*. Totowa(NJ): Human A Press; 2000. p. 3-7.
- Batal M, Boudry I, Mouret S, Clery-Barraud C, Wartelle J, Berard I, et al. DNA damage in internal organs after cutaneous exposure to sulphur mustard. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014;278(1):39-44.
- Kehe K, Schrettl V, Thiermann H, Steinritz D. Modified immunoslot blot assay to detect hemi and sulfur mustard DNA adducts. *Chem Biol Interact*. 2013;206(3):523-8.
- Kehe K, Schneider J, Emmeler J, Kreppel H, Abend M, Szinicz L. Effects of sulfur mustard on fibroblast and keratinocyte co-cultures. *Toxicology*. 2007;233(1-3):234-5.
- Ray R, Legere RH, Majerus BJ, Petrali JP. Sulfur mustard-induced increase in intracellular free calcium level and arachidonic acid release from cell membrane. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1995;131(1):44-52.
- Hur GH, Kim YB, Choi DS, Kim JH, Shin S. Apoptosis as a mechanism of 2-chloroethyl ethyl sulfide-induced cytotoxicity. *Chem Biol Interact*. 1998;110(1-2):57-70.
- Meier HL, Millard CB. Alterations in human lymphocyte DNA caused by sulfur mustard can be mitigated by selective inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1404(3):367-76.
- Herceg Z, Wang ZQ. Functions of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death. *Mutat Res*. 2001;477(1-2):97-110.
- Detheux M, Jijakli H, Lison D. Effect of sulphur mustard on the expression of urokinase in cultured 3T3 fibroblasts. *Arch Toxicol*. 1997;71(4):243-9.
- Heinrich A, Balszuweit F, Thiermann H, Kehe K. Rapid simultaneous determination of apoptosis, necrosis, and viability in sulfur mustard exposed HaCaT cell cultures. *Toxicol Lett*. 2009;191(2-3):260-7.
- Pohanka M. Antioxidants countermeasures against sulfur mustard. *Mini Rev Med Chem*. 2012;12(8):742-8.

28. Sawyer TW, Hamilton MG. Effect of intracellular calcium modulation on sulfur mustard cytotoxicity in cultured human neonatal keratinocytes. *Toxicol In Vitro*. 2000;14(2):149-57.
29. Inturi S, Tewari-Singh N, Gu M, Shrotriya S, Gomez J, Agarwal C, et al. Mechanisms of sulfur mustard analog 2-chloroethyl ethyl sulfide-induced DNA damage in skin epidermal cells and fibroblasts. *Free Radic Biol Med*. 2011;51(12):2272-80.
30. Shin S, Choi DS, Kim YB, Cha SH, Sok DE. The release of lysosomal arylsulfatase from liver lysosomes exposed to 2-chloroethylethyl sulfide. *Chem Biol Interact*. 1995;97(3):229-38.
31. Joseph LB, Gerecke DR, Heck DE, Black AT, Sinko PJ, Cervelli JA, et al. Structural changes in the skin of hairless mice following exposure to sulfur mustard correlate with inflammation and DNA damage. *Exp Mol Pathol*. 2011;91(2):515-27.
32. Moser J, Levine CF, Thomas-Dunmeyer DR, Smith WJ. Cross-linking interferes with assessing sulfur mustard-induced DNA damage in human peripheral blood lymphocytes using the comet assay. *Toxicol Mech Methods*. 2004;14(3):195-202.
33. Kehe K, Müller H, Balszuweit F, Steinritz D, Thiermann H, Klaus S, et al. New methods to detect sulfur mustard (SM) and SM induced skin damage. In: Dishovsky C PA, editor. Counteraction to chemical and biological terrorism in east European countries. Dordrecht (Netherland): Springer; 2009. p. 127-33.
34. Jafari M. Dose- and time-dependent effects of sulfur mustard on antioxidant system in liver and brain of rat. *Toxicology*. 2007;231(1):30-9.
35. Roshanzamir T, Mirkheshti N, Ghassami F, Afshar Moghadam N, Alavi S. Bcl-2 protein expression in pulmonary specimens of sulfur mustard victims. *Tanaffos*. 2008;7 (1):25-31.
36. Ray R, Benton B, Hauck S, Carpin C, Rosenthal D. Apoptosis due to sulfur mustard (SM) in human epidermal keratinocytes (NHEK) and human airway epithelial cells (HAEC): Mechanisms and intervention. *FASEB J*. 2006;20:A121.
37. Michaelson S. DNA fragmentation pattern induced in thymocytes by sulphur mustard. *Chem Biol Interact*. 2000;125(1):1-15.
38. Rosenthal DS, Simbulan-Rosenthal CM, Iyer S, Spoonde A, Smith W, Ray R, et al. Sulfur mustard induces markers of terminal differentiation and apoptosis in keratinocytes via a Ca²⁺-calmodulin and caspase-dependent pathway. *J Invest Dermatol*. 1998;111(1):64-71.
39. Jafari M, Nateghi M, Rabbani A. Interaction of sulfur mustard with rat liver salt fractionated chromatin. *Int J Biol Macromol*. 2010;46(1):104-8.