اثر مقادیر تحت کشنده گاز خردل بر روی آنزیم استیل‌کولین استراز در آزمایشات درون تن و برون تن

دکتر عبدالمجید چراغعلی[۱]، دکتر حسینعلی مهرانی[۲]

SID

Title: *In vitro and in vivo effects of sublethal doses of sulfur mustard on acetylcholine esterase.*

Authors: *Cheraghali AM,(PhD); Mehrani HA,(PhD).*

Abstract: *Even half century after the first use of sulfur mustard as a chemical weapon, it is still being used occasionally in regional and international conflicts. Sulfur mustard is a non-selective alkylating agent, which has been used as chemical warfare many times in last decades. It has devastating effects on numerous tissues and biomolecules and could cause painful death after exposure to its lethal doses. One of the most important enzymes which may be affected by sulfur mustard is acetylcholine esterase (AchE), enzyme responsible for cleavage of acetylcholine and termination of its effect in cholinergic nerve system. The enzyme is the main target for organophosphate and carbamate pesticides.*

To evaluate the effects of sublethal doses of sulfur mustard on AchE, 500 microlitter of purified serum AchE in phosphate buffer incubated with different concentrations of sulfur mustard at 25℃ for 10 min. Determination of enzyme showed a significant reduction of enzyme activity. Also to evaluate effect of oximes on recovery of sulfur mustard inhibited AchE, pralidoxime has been used both before and after incubation. Intraperitonal injections of 5 and 10 mg/kg of sulfur mustard significantly reduced AchE activity in serum, muscles and RBCs. However, the reduction of AchE activity in the liver and brain was not significant.

The results of the study indicate that sulfur mustard even in sublethal doses significantly inhibits AchE. However, mechanism of inhibition is different from that of organophosphate pesticides.

Keywords: *sulfur mustrad, acetylcholinesterase, pralidoxime, rat.*

www.SID.ir

۱- گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)
۱- گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)

Archive of SID

www.SID.ir

چکیده:

بعد از گذشت حدود ۵۰ سال از اولین کاربرد سولفور موستارد(گاز خردل) به عنوان سلاح شیمیائی این عامل همچنان به عنوان یک عامل خطرناک در جنگ ها مورد استفاده قرار می‌گیرد و در جنگ تحمیلی ۸ ساله عراق علیه ایران به دفعات به میزان وسیعی توسط نیروهای عراقی بر علیه نظامیان و غیر نظامیان ایرانی و عراقی مورد استفاده قرار گرفت. گاز خردل یک عامل آلکیله کننده بسیار قوی و غیر اختصاصی است که قادر است به کلیه بافت‌ها آسیب‌های شدیدی وارد نماید. مهار و یا تخریب آنزیم استیل کولین استراز باعث تجمع استیل کولین در سیناپس‌های عصبی و ایجاد اثرات تحریکی کولینرژیک می‌شود. هدف از مطالعه حاضر بررسی تاثیر غلظت‌های تحت کشنده گاز خردل در آزمایشات برون تن و درون تن بر روی آنزیم کولین استراز است.

در آزمایشات برون تن اثرات مهاری خردل بر روی آنزیم تخلیص شده مورد آزمایش قرار گرفت. در بررسی بازیابی مجدد آنزیم غیر فعال شده توسط اکسیم، پرالیدوکسیم بعد از مدت دو ساعت موجب بازیابی قابل ملاحظه‌ای درفعالیت آنزیم مهار شده نگردید. انکوباسیون آنزیم با اکسیم قبل از مهار خردل نیز همین نتیجه را در برداشت. بررسی سینیتیکی نشان داد اثر مهاری خردل بر روی آنزیم غیر اختصاصی بوده و خردل به عنوان مهار کننده رقابتی جایگاه فعال عمل نمی‌کند. تزریق دزهای ۵ و ۱۰ میلیگرم خردل به ازای هر کیلو گرم حیوان موجب کاهش معنی‌داری در فعالیت آنزیم کولین استراز در گلبول های قرمز سرم و عضلات شد. در صورتیکه در این غلظت ها تغییرات قابل ملاحظه ای در بافت‌های کبدی و مغزی مشاهده نشد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که گاز خردل در مقادیر کمتر از دوز کشنده نیز قادر است آنزیم استیل کولین استراز را به میزان قابل ملاحظه‌ای مهار نماید. استفاده از پرالیدوکسایم قبل یا بعد از تزریق گاز خردل در آزمایشات برون تن نتوانست اثر حفاظتی قابل توجهی برای آنزیم استیل کولین استراز ایجاد نماید.

گل‌واژگان: *گاز خردل، استیل کولین استراز، پرالیدوکسایم، موش صحرائی.*

مقدمه:

بعد از گذشت حدود ۵۰ سال از اولین کاربرد سولفور موستارد (گاز خردل) به عنوان سلاح شیمیائی این عامل بدلیل اثرات مخرب برروی بافت‌های مختلف بدن و عدم وجود پادزهر مناسب و مؤثر بر علیه آن همچنان به عنوان یک عامل خطرناک در جنگ‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد(۱و۲). این عامل در جنگ تحمیلی ۸ ساله عراق علیه ایران به دفعات به میزان وسیعی توسط نیروهای عراقی بر علیه نظامیان و غیر نظامیان ایرانی و عراقی مورد استفاده قرار گرفت و تلفات و ضایعات انسانی زیادی ایجاد کرد(۳و۴). گاز خردل یک عامل آلکیله کننده بسیار قوی و غیر اختصاصی است که قادر است به کلیه بافت‌ها آسیب‌های شدیدی وارد نماید.

متاسفانه بدلیل عدم شناخت مکانیسم دقیق ایجاد ضایعات ناشی از گاز خردل امکان مقابله سریع و مؤثر بر علیه این عامل وجود ندارد و در اغلب موارد ضایعات ناشی از گاز خردل بصورت علامتی درمان می‌شود. ضایعات ناشی از گاز خردل را می‌توان به دو دسته کوتاه و بلند مدت تقسیم‌بندی کرد. ضایعات کوتاه مدت گاز خردل که عمدتاً ناشی از تماس با غلظت‌های نسبتا بالای عامل ایجاد می‌شود بصورت ضایعات پوستی چشمی تنفسی و سیستم اعصاب ظاهر می‌شود که در صورت شدید بودن باعث مرگ مصدوم می‌شود(۵). در صورتیکه عوارض دیررس خردل عمدتاً بر روی دستگاه تنفسی و سیستم مغز استخوان مصدوم متمرکز است(۵و۶). گاز خردل یک عامل موتاژن بسیار قوی است که اثرات موتاژنیک آن در آزمایشات برون تن بر روی انواع سلول‌های انسانی و باکتریائی ثابت شده است(۶). همچنین مطالعات زیادی وجود دارد که اثرات کارسینوژنیک گاز خردل را در صورت تماس مزمن با آن تأیید می‌نماید.

مهمترین عامل ایجاد کننده ضایعات ناشی از گاز خردل مرگ سلولی است که بدنبال آلکیلاسیون اهداف حساس داخل سلول ایجاد می‌شود. آلکیلاسیون در مراحل بعد به تحریک پروسه‌های تخریبی دیگری در سلول منجر می‌شود که در نهایت مرگ سلول

Archive of SID
www.SID.ir

را سبب می شود. با این وجود مکانیسم واحدی را نمی‌توان برای تمام عوارض ناشی از گاز خردل مطرح کرد و در حال حاضر چند مکانیسم مهم در مورد اثرات گاز خردل مطرح است که هر یک قادر به توجیه بخشی از عوارض ناشی از گاز خردل است(۲). اثرات مهم گاز خردل بر متابولیسم انرژی سلول و بخصوص مهار گلیکولیز است که نقش بسیار مهمی در مرگ سلولی در مرحله حاد آسیب ناشی از گاز خردل دارد(۲و۵). اگر چه این مکانیسم ممکن است اثرات سمی خردل را بر روی سلول‌ها توجیه نماید ولی بعضی از سلول‌ها از جمله سلول‌های طحال و مغز به این اثرات گاز خردل حساس نیستند.

فرضیه پلی ADP ریبوز پلی مراز(PADPRP) تا حد زیادی ایجاد تاول ناشی ازتماس گاز خردل با سلول‌های پوستی را تفسیر میکند(۲). از طرف دیگر برمبنای فرضیه تیول-کلسیم اثرات گاز خردل از مرحله تاثیر آن به عنوان یک عامل اکسیداتیو در سلول‌های کبدی آغاز می‌شود. بنظر می‌رسد مهمترین مرحله ایجاد سمیت کاهش سطح تیول‌های سلولی است که منجر به افزایش کلسیم سیتوپلاسمی می‌شود. باید به‌این نکته توجه داشت که غلظت‌هائی از گاز خردل که تاول پوستی و چشمی ایجاد می‌کند قادر نیست میزان گلوتاتیون سلول را تا حد ایجاد مرگ سلولی پائین آورد. بنابراین بنظر می‌رسد تخلیه انرژی سلول می‌تواند در شروع عوارض سمی ناشی از گاز خردل نقش تعیین کننده‌ای داشته باشد. غلظت‌های زیاد کلسیم باعث فعال شدن پروتئینازهای وابسته به‌کلسیم، فسفولیپازها و اندونوکلئازها می‌شود که اثرات سمی بر سلول ایجاد می‌کند. این آنزیم‌ها با آسیب رساندن به جدار سلول مرگ سلولی را تسریع می‌کنند(۵).

با توجه به ماهیت غیراختصاصی بودن مکانیسم اثر گاز خردل این عامل می‌تواند بر تمام ارگانها و بافت‌های بدن از جمله آنزیم‌ها تأثیر مستقیم و غیر مستقیم داشته باشد. تاثیرات مخرب گاز خردل بر آنزیم‌های متفاوت می‌تواند اثرات سمی این عامل را تشدید نماید. آنزیم استیل کولین استراز آنزیمی است که تجزیه استرها را در بدن بعهده دارد. این آنزیم دارای ایزوفرم‌های متفاوتی‌است. نوعی که درسیستم عصبی- عضلانی و گلبول‌های قرمز موجود است به کولین استراز واقعی[1] معروف است که هیدرولیز استیل کولین را عهده داراست. کولین استراز دیگری در سرم، سلول های مغزی و کبد موجود است که به شبه کولین استراز[2] یا بوتیریل کولین استراز معروف است و قادر به هیدرولیز اغلب ترکیبات استری است(۷). این آنزیم ها بدلیل ساختمان شیمیائی که دارند براحتی تحت تأثیر غلظت‌های بالای گاز خردل قرار می‌گیرند. این آنزیم مسئول تجزیه و پایان اثرات استیل کولین که یک نوروترانسمیتر سیستم کولینرژیک است می‌باشد. مهار و یا تخریب آنزیم باعث تجمع استیل کولین در سیناپس‌های عصبی و ایجاد اثرات تحریکی کولینرژیک می‌شود. این علائم مشابه علائم بالینی ناشی از مسمومیت با ترکیبات ارگانوفسفره و گازهای اعصاب است و ممکن است برای کنترل آنها به درمان آنتی کولینرژیک نیاز باشد. آنزیم استیل کولین از طریق هیدرولیز استیل کولین به استات و کولین به اثرات آن خاتمه می‌دهد. ترکیباتی بنام اکسایم‌ها وجود دارند که با جابجا کردن بیوشیمیائی گروه نوکلئوفیل گروه فسفوریل از کمپلکس ترکیبات مهارکننده ارگانوفسفره و آنزیم استیل کولین استراز قادرند آنزیم را آزاد نمایند(۵).

با این وجود گزارشات متناقضی از تاثیر گاز خردل بر آنزیم استیل کولین استراز وجود دارد. این گزارشات هر دو اثر مهاری و تحریکی را بر آنزیم کولین استراز نشان می‌دهند. اگر چه اضافه کردن گازخردل به محیط کشت سلول‌های نوروبلاستومای موش باعث افزایش تولید کولین‌استراز به میزان ۵ برابر گردیده‌است(۸). ولی اغلب گزارشات نشان دهنده تاثیر مهاری گاز خردل بر آنزیم استیل کولین استراز است(۹). همچنین گزارشاتی وجود دارد که نشان می‌دهد مجروحین ایرانی که طی جنگ تحمیلی با گاز خردل مصدوم شده‌اند به کاهش کولین استراز مبتلا شده‌اند(۱۰). در بعضی از این مجروحین کاهش به میزانی شدید بوده است که علائم کولینرژیک در آنها مشاهده شده است که به درمان آنتی کولینرژیک نیاز داشته‌اند(۴). به منظور بررسی تأثیر غلظت‌هائی از گاز خردل که علائم بالینی قابل توجهی ایجاد نمی‌نماید این مطالعه بر روی آنزیم استیل کولین استر طراحی گردید. این موضوع از آن جهت اهمیت دارد که مصدومینی که بصورت مزمن با گاز خردل در تماس بوده‌اند ممکن است برای کنترل بعضی از علائم بالینی بخصوص علائم تنفسی به درمان آنتی کولینرژیک نیاز داشته باشند.

هدف از مطالعه حاضر بررسی تاثیر غلظت‌های تحت کشنده گاز خردل در آزمایشات برون تن و درون تن بر روی آنزیم کولین استراز و همچنین ارزیابی مکانیسم این اثر است. با توجه به نقش مهم درمان آنتی‌کولینرژیک در کنترل علائم ناشی از مهار آنزیم کولین استراز امکان آزادسازی آنزیم مهار شده با ترکیبات اکسایم‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفته است.

روش کار:

[1] - true cholinesterase
[2] - pseudo cholinesterase

www.SID.ir
Archive of SID

تمام مواد شیمیایی مصرف شده در این تحقیق به غیر از گاز خردل از شرکت سیگما – آلدریچ آلمان تهیه شده است. پرالیدوکسایم مصرف شده از داروخانه‌های سطح شهر تهیه گردید. موش‌های آزمایشگاهی(rat) از جنس نر و نژاد Sprague-Dawley با وزن ۲۵۰–۱۵۰ گرم و سن سه ماهه از انستیتو پاستور ایران خریداری شد.

آلوده نمودن موشها: موش‌ها را توزین نموده و در قفس‌های جداگانه به مدت دوهفته که آب و غذای کافی در اختیار داشتند، در حیوانخانه در دمای۲۵–۲۰ درجه سانتیگراد، با ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند، تا به شرایط محیط عادت نمایند. سپس آنهارا به سه گروه ۶ تایی به صورت زیر تقسیم نمودیم:

گروه اول: گروه کنترل که فقط حلال دریافت نمودند.

گروه دوم: گروه تجربی یک، که ۵ میلی‌گرم بر کیلو گرم وزن بدن خردل گوگردی بصورت داخل صفاقی دریافت نمودند.

گروه سوم: گروه تجربی دو، که ۱۰ میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن خردل گوگردی بصورت داخل صفاقی دریافت نمودند.

کلیه احتیاطات لازم درهنگام تزریق گازخردل به حیوان برای جلوگیری از احتمال آلودگی آزمایش کننده با عامل مد نظر بوده است.

نحوه تزریق خردل: سولفور موستارد(گاز خردل) را با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در بافر فسفات ده میلی مولار pH=۷ حاوی ۵ درصد حجمی دی متیل سولفوکسید(DMSO) حل نموده و به گروه تجربی یک و دو با استفاده از سرنگ‌های انسولین ازطریق داخل صفاقی تزریق گردید. به گروه کنترل بافر حاوی دی متیل سولفوکسید تزریق گردید. لازم به ذکر است که حجم مواد تزریقی برای هر سه گروه یکسان و ۰/۵ میلی لیتر بود. پس از ۴۸ ساعت از تزریق تمام حیوان‌ها توسط اتر بیهوش و به مقدار دو میلی‌لیتر خون از آئورت آنها گرفته‌شد. بافت‌های مختلف جهت مطالعات آنزیمی در ازت مایع منجمد و تاموقع آزمایش درمنهای ۸۰°C نگهداری شد.

روش اندازه‌گیری متابولیت‌های سرمی و آنزیم: نمونه خون را به لوله‌های سانتریفیوژ منتقل نموده و پس از کامل شدن انعقاد در ۴°C با نیروی ۲۵۰۰g به مدت ده دقیقه سانتریفیوژ گردید. سرم را جدا نموده وبلافاصله به فریزر منتقل و در منهای ۲۰ درجه سانتیگراد تا زمان آزمایش نگهداری گردید. جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کولین استراز درگلبول‌های قرمز، پس از تخلیه سرم گلبول‌های قرمز با دو حجم سالین در بافر فسفات (PBS) غوطه‌ور شده و طبق روش فوق سانتریفیوژ شد. این عمل مجدداً تکرار گردید و گلبول‌های قرمز شسته شده جهت اندازه‌گیری فعالیت طبق روش زیر بکار رفت.

تهیه نمونه جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کولین استراز: بافت‌های منجمد شده در منهای ۸۰°C به دقت با ترازوی آنالیتیکال توزین و با نسبت حجمی – وزنی ۵:۱ در بافر استخراج (تریس– هیدروکلرید ۲۰ میلی‌مولار pH=۷/۴، حاوی کلرید منیزیم ۵ میلی‌مولار، EDTA ۲ میلی‌مولار، فنیل متیل سولفونیل فلوراید(PMSF) یک میلی مولار و تریتون X-100 یک در صد حجمی) توسط هموژنایزر به مدت ۳۰ ثانیه هموژنه شد. پس از آن نمونه‌ها در ۱۵۰۰۰ g در ۴°C به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع فوقانی[1] جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم بکار برده‌شد. گلبول‌های قرمز شسته شده در ده برابر حجم در آب مقطر دو بار تقطیر لیز شد و طبق روش قبلی در ۲۵۰۰g سانتریفیوژ گشت. مایع فوقانی جهت اندازه‌گیری فعالیت کولین استراز بکار رفت.

اندازه گیری فعالیت آنزیم: اندازه‌گیری فعالیت کولین استراز بافتی، گلبول‌های قرمز و سرم به روش تغییر یافتهEdman(۱۱) انجام گرفت. بطور خلاصه، ۱۰ میکرو لیتر عصاره بافتی و یا سرم به ۳ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار، pH=۷/۶ حاوی دی تیو دی نیترو بنزوئیک اسید(DTNB) ۰/۲۵ میلی مولار افزوده می شد. سپس به مدت ۵ دقیقه در ۲۵°C انکوبه و با افزودن ۲۰۰ میکرو لیتر سوبسترای استیل تیو کولین ۴۵ میلی‌مولار جهت اندازه‌گیری کولین استراز بافتی و گلبول‌های قرمز و یا ۲۰۰ میکرولیتر سوبسترای بوتیریل کولین استراز ۳۰ میلی‌مولار جهت اندازه‌گیری کولین استراز سرمی واکنش شروع می‌شد. بعد ازمدت ۵ دقیقه با افزودن ۳۰۰ میکرولیتر کوئینیدین سولفات واکنش متوقف و جذب نمونه‌ها در۴۱۰ نانومتر با اسپکترو فوتومتر اندازه‌گیری می‌شد.

بررسی اثر مهاری و بازیابی مجددآنزیم کولین استراز: در این آزمایش از آنزیم کولین استراز سرم انسانی که در گروه بیوشیمی دانشگاه بقیه الله(عج) تخلیص شده بود استفاده شد. بطور خلاصه جهت تخلیص آنزیم ابتدا فراکسیناسیون آمونیوم سولفات و سپس توسط پلی اتیلن گلایکول بخش‌های فعال جمع‌آوری شد و در مرحله بعد با استفاده از ستون کروماتوگرافی تعویض یونی به ترتیب دی اتیل آمینو الکل سفادکس و سپس CL- 6B و در نهایت فیلتراسیون ژلی آنزیم تخلیص گردید. برای آزمایش ابتدا ۵۰۰ میکرولیتر آنزیم در ۲ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار pH=۷/۴ در لوله‌های جداگانه با افزودن مقادیر

[1] - supernatant

Archive of SID
www.SID.ir

متفاوت ۰-۷ میلی‌مولار از خردل گوگردی(در آب مقطر حاوی ۵ درصد دی متیل سولفوکسید حل شده بود) به مدت ده دقیقه در دمای ۲۵°C انکوبه شد. سپس نمونه‌های ۲۰ میکرولیتری جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم باقیمانده، طبق روش فوق در اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی بکار برده شد. لوله شاهد حاوی آنزیم و دی متیل سولفوکسید در بافر فسفات بود.

جهت بررسی بازیابی فعالیت آنزیم مهار شده از پرالیدوکسایم (2-PAM) استفاده شد. نمونه‌های آنزیمی طبق روش فوق توسط ۰/۵ میلی مولار گاز خردل به مدت ده دقیقه مهار شدند. سپس غلظت‌های مختلف از اکسیم(حل شده در آب مقطر دو بار تقطیر) به نمونه‌ها افزوده شد و با فواصل زمانی ۱۰ دقیقه نمونه‌برداری و فعالیت آنزیمی اندازه‌گیری شد. در آزمایش جداگانه‌ای ابتدا آنزیم در حضور اکسیم انکوبه شد و بعد از ۳۰ دقیقه نمونه خردل به محلول واکنش اضافه شد. در هر دو آزمون نمونه‌های شاهد حاوی اکسیم بدون مهار کننده و مهار کننده بدون اکسیم بودند.

اکسیم با غلظت ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر (۷۵ میلی مولار) در آب مقطر حل گردید. سپس حجم های ۱۰۰ میکرو لیتری با غلظت‌های ۵-۰ میلی‌مولار جهت فعال نمودن آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این آزمایش برای غلظت ۱ میلی مولار در نمودار شماره ۱ آورده شده است. چون تفاوتی بین ۰/۵ تا ۵ میلی‌مولار مشاهده نشد از غلظت ۱ میلی مولار به عنوان غلظت مورد آزمایش استفاده گردید.

آنالیز داده ها با استفاده از روش آماری Student's t-test و یا آنالیز واریانس(ANOVA) به همراه مقایسه‌های چندگانه انجام گرفت تمام داده‌ها به صورت Mean ± SEM گزارش شده است. برای محاسبه IC50 آنزیم از برنامه Minova استفاده گردید.

یافته‌ها:

فعالیت کولین استراز سرمی در گروه شاهد و گروه‌های تجربی تفاوت محسوسی را نشان می‌دهد. در هر دو گروه تجربی فعالیت آنزیم نسبت به گروه شاهدکاهش معنی‌داری دارد و میزان کاهش متناسب با دز دریافتی خردل در این گروههاست. تزریق دزهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم خردل به ازای هر کیلو گرم حیوان موجب کاهش معنی‌داری در فعالیت آنزیم کولین استراز سرم و عضلانی شد. در صورتیکه در این غلظت‌ها تغییرات قابل ملاحظه‌ای در بافت‌های کبدی و مغزی مشاهده نشد. فعالیت آنزیم کولین استراز گلبول های قرمز نیز کاهش معنی داری در گروه تجربی دو نشان داد(جدول شماره ۱).

جهت بررسی سینیتیک خردل بر روی فعالیت آنزیم کولین استراز تخلیص شده از سرم انسان، آنزیم در معرض غلظت‌های متفاوتی از خردل قرار گرفت. مقدار ۵۰ در صد مهاری(IC50) خردل برابر ۰/۵ میلی مول در لیتر بدست آمد(نمودار شماره ۱). از نتایج بدست آمده در این آزمون برای تعیین دوز تزریقی به موشها در آزمایشات درون تن استفاده گردید. مقادیر ۲۵٪ و ۵۰٪ میزان IC50 که به ترتیب ۰/۱۲۵ و ۰/۵ میلی مولار یا ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بود انتخاب گردید.

جدول ۱- فعالیت آنزیم کولین استراز در بافت های مختلف گروههای آزمایشی(n=6)

بافت / گروه‌آزمایشی	گلبول های قرمز (U/g)	سرم (U/L)	کبد (U/g)	مغز (U/g)	عضله (U/g)
گروه کنترل	۳۲۵ ±(۲۸)	۲۷۱ ±(۱۸)	۱۲۹۸ ±(۱۳۲)	۱۵۵۹ ± (۱۷٤)	٥٤٢ ± (۸۹)
گروه تجربی یک	۲۹۵ ±(٤۳)	۲۰۱ ±(۳٤)	۱٤۰٦ ±(۱۹۲)	۱٥٦٥ ± (۱٦۳)	*۳٤۱ ± (٦۲)
گروه تجربی دو	*۲٤٥ ± (۳۲)	*۱۹۰ ±(۱٤)	۱۱۱۰ ±(۱٥۱)	۱٤۱٤ ± (۱۷۰)	*۳٥٥ ± (۳۹)

در هرگروه ٦ راس حیوان بود. فعالیت آنزیم در بافت های مختلف بر حسب واحد بین المللی در گرم بافت (U/g) است. مقادیر ارائه شده بصورت (خطای معیار.± میانگین) است.

* نسبت به گروه شاهد کاهش معنی داری را نشان می دهد ($P < 0.05$).

Archive of SID

www.SID.ir

نمودار ۱- فعالیت آنزیم کولین استراز سرم انسان در مقابل غلظت‌های مختلف خردل گوگردی. نتایج میانگین ۴ آزمون متفاوت است

در آزمایشات برون تن اثرات مهاری خردل بر روی آنزیم تخلیص شده مورد آزمایش قرار گرفت. در بررسی بازیابی مجدد آنزیم غیر فعال شده توسط اکسیم، اکسیم بعد از مدت دو ساعت موجب بازیابی قابل ملاحظه‌ای در فعالیت آنزیم مهار شده نگردید. انکوباسیون آنزیم با اکسیم قبل از مهار خردل نیز همین نتیجه را در برداشت(نمودار شماره ۲). بررسی سینتیکی نشان داد اثر مهاری خردل بر روی آنزیم غیر اختصاصی بوده و خردل به عنوان مهار کننده رقابتی جایگاه فعال عمل نمی‌کند بلکه کل ساختمان آنزیم را تحت تاثیر قرار می‌دهد.

نمودار ۲- فعالیت آنزیم کولین استراز سرمی در حضور خردل گوگردی(سولفور مورستاد) و بازیابی مجدد آنزیم توسط پرالیدوکسیم. گروه کنترل، آنزیم در حضور پرالیدوکسایم، آنزیم در حضور سولفور موستارد و آنزیم در حضور سولفور موستارد و پرالیدوکسایم. داده‌ها میانگین ٤ آزمون متفاوت و خطای معیار آن است.
* در حضور سولفور موستارد فعالیت آنزیم کاهش معنی‌داری دارد و با حضور پرالیدوکسایم فعالیت بازیابی نشده است($P<0.005$).

بحث و نتیجه‌گیری:

گاز خردل بدلیل توانائی آلکیلاسیون غیر اختصاصی قادر است فعالیت بیولوژیک تعداد قابل توجهی از ملکول‌های حیاتی را در داخل بدن مهار نماید. همچنین این گاز در محیطهای مائی با ایجاد دو حلقه بسیار فعال الکتروفیل در ساختمان خود قادر است کلیه ملکول‌های نوکلئوفیل ازجمله آنزیم‌ها و پروتئین‌ها را آلکیله نماید و با غیر فعال نمودن آنها آسیب‌های بیولوژیک جدی ایجاد نماید. همین واکنش‌های غیر اختصاصی است که در مسمومیت حاد با خردل باعث ایجادعوارض مخاطره آمیز می‌گردد. با این وجود گاز خردل در مقادیر کمتر از دوز کشنده نیز می‌تواند عوارض مشابهی ایجاد نماید. در صورت نفوذ گاز خردل به جریان عمومی گردش خون که بدلیل خواص لیپوفیلیک حتی بعد از تماس جلدی بسیار به سرعت اتفاق می‌افتد تعداد قابل توجهی ازآنزیم‌ها و پروتئین‌های حیاتی تحت تاثیر اثرات مخرب آن قرار می‌گیرند. یکی از مهمترین آنزیم‌هائی که تحت تاثیر گاز خردل قرار می‌گیرد آنزیم استیل کولین استراز است. این آنزیم استیل کولین که میانجی عصبی سیستم کولینرژیک است را هیدرولیز می‌کند. این آنزیم هدف اصلی حشره کش‌های کارباماتی و ارگانوفسفره و گازهای اعصاب است. مهار آنزیم استیل کولین استراز باعث تجمع استیل کولین و بحران سیستم کولینرژیک و نهایتاً مرگ مصدوم خواهد شد. اگرچه این آنزیم به عنوان یک هدف اختصاصی برای گاز خردل نیست مانند سایر پروتئین‌ها می‌تواند مورد حملات الکتروفیلیک گاز خردل قرار گیرد. مهار این آنزیم توسط گاز خردل می تواند با ایجاد علائم مسمومیت ناشی از بحران سیستم کولینرژیک سایر علائم مسمومیت با گاز خردل را پیچیده نماید و ممکن است برای کنترل علائم ناشی از آن به درمان آنتی کولینرژیک نیاز باشد. همچنین گزارشاتی مبنی بر احتمال حضور دراز مدت مقادیرکم گاز خردل در بافت‌های چربی بدن تا مدت‌ها بعد از مسمومیت اولیه وجود دارد. آزاد شدن تدریجی گاز خردل از بافت‌های چربی و ورود مجدد آن به گردش خون می‌تواند با مهار آنزیم علائم کولینرژیک ایجاد کرده و لزوم درمان مزمن آنتی کولینرژیک را نیز مطرح نماید.

به منظور بررسی میزان تاثیر و همچنین مکانیسم اثر مقادیر تحت کشنده گاز خردل بر آنزیم استیل کولین استراز مقادیر متفاوت گاز خردل با آنزیم کولین استراز خالص شده از سرم انکوبه شد(نمودار شماره ۱). نتایج این آزمایش نشان داد ۰/۵ میلی‌مولار گاز خردل قادر است فعالیت آنزیم استیل کولین استراز را به نصف کاهش دهد. با توجه به اطلاعات فوق دو غلظت ۵ و ۱۰mg/kg (معادل ۲۵٪ و ۵۰٪ مقدار IC50) گاز خردل به عنوان

Archive of SID
www.SID.ir

غلظت‌های آزمون درآزمایشات درون تن مورد استفاده قرارگرفت. این غلظت‌ها در حدی بودند که در کوتاه مدت هیچگونه علائم حاد بالینی در موش‌ها ایجاد نکردند. واکنش حشره‌کش‌های ارگانو- فسفره با آنزیم استیل کولین استراز یک واکنش دو مرحله ای است که در مرحله اول واکنش برگشت پذیر بوده و با استفاده از بعضی ترکیبات از جمله اکسایم‌ها(شامل پرالیدوکسایم و ابیدوکسایم) می‌توان واکنش را به مرحله قبل برگرداند و آنزیم را آزاد کرد ولی در مرحله دوم واکنش بدلیل ایجاد پدیده aging امکان بازیابی آنزیم از بین می‌رود. به منظور بررسی مکانیسم اثر گازخردل بر روی آنزیم استیل‌کولین استراز و امکان بازیابی آنزیم مهار شده توسط پرالیدوکسایم آنزیم در حضور و عدم حضور این اکسایم با گاز خردل انکوبه شد. در آزمایش اول آنزیم به مدت ۱۰ دقیقه با گاز خردل در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد انکوبه شد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم در پایان این مدت نشان داد که فعالیت آنزیم به میزان قابل توجهی توسط گاز خردل مهار شده است (نمودار شماره ۲). بعد از آن به منظور امکان بازیابی آنزیم توسط پرالیدوکسایم غلظت ۱ میلی‌مولار پرالیدوکسایم به مخلوط آنزیم و گازخردل اضافه گردید و با نمونه گیری‌های متوالی به فاصله هر ۱۰ دقیقه تا دو ساعت فعالیت آنزیم بررسی گردید. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که پرالیدوکسایم قادر به آزادسازی آنزیم مهار شده نمی‌باشد(نمودار شماره ۲). این یافته میتواند اینگونه تفسیر شود که محل اتصال گاز خردل به آنزیم استیل کولین استراز با محل اتصال حشره کش‌های ارگانوفسفره با این آنزیم متفاوت است ویا اینکه اتصال گاز خردل به آنزیم از همان ابتدا به صورت کووالان و برگشت ناپذیر است. همچنین به منظور بررسی اثر حفاظتی پرالیدوکسایم با آنزیم استیل کولین استراز در آزمایش جداگانه ای ابتدا آنزیم به همراه پرالیدوکسایم به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد و سپس گاز خردل به محیط واکنش اضافه گردید. نتایج حاصل از این آزمایش نیز با آزمایش قبلی مشابه بود و نشان داد که پرالیدوکسایم قادر به حفاظت آنزیم استیل کولین استراز در مقابل گاز خردل نیست.

به منظور بررسی اثرات گاز خردل بر آنزیم استیل کولین استراز در آزمایشات درون تن میزان ۵ و ۱۰ mg/kg گاز خردل داخل صفاق موش‌ها تزریق گردید. این میزان گاز خردل هیچگونه علائم مشخص بالینی در حیوان ایجاد نکرد. بعد از ۴۸ ساعت از خون عضله مغز و کبد موش‌ها نمونه برداری شد و میزان فعالیت آنزیم در مقایسه با گروه شاهد بررسی گردید. نتایج این آزمایش در جدول شماره ۱ حلاصه شده است. نتایج این آزمایش نشان دهنده کاهش بارز فعالیت آنزیم در سرم و گلبول های قرمز و همچنین بافت عضله موش ها است. با این وجود کاهش فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در کبد و مغز قابل توجه نبوده است. اگرچه علائم مسمومیت CNS از علائم مسمومیت حاد با گاز خردل است بنظر میرسد علت عدم کاهش بارز فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در مغز ناشی از عدم دسترسی غلظت های کم گاز خردل به این بافت بدلیل وجود سد خونی – مغزی است.

همچنین عدم کاهش قابل ملاحظه فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در کبد نیز می‌تواند بدلیل وجود مقادیر قابل توجه ترکیبات نوکلئوفیل از جمله گلوتاتیون باشد که قادرند براحتی مقادیر کم گاز خردل را خنثی کرده و مانع تاثیرات مخرب آن بر روی آنزیم گردند.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که گاز خردل در مقادیر کمتر از دوز کشنده نیز قادر است آنزیم استیل کولین استراز را به میزان قابل ملاحظه ای مهار نماید. با این وجود بنظر میرسد مکانیسم این مهار با آنچه توسط حشره کش‌های ارگانوفسفره اتفاق می افتد کاملاً متفاوت است. استفاده از پرالیدوکسایم قبل یا بعد از تزریق گاز خردل در آزمایشات برون تن نتوانست اثر حفاظتی قابل توجهی برای آنزیم استیل کولین استراز ایجاد نماید. مهار این آنزیم در غلظت های کمتر از دوز کشنده گاز خردل اهمیت استفاده از درمان آنتی کولینرژیک را در مصدومین گاز خردل و بخصوص آنهائی که به مسمومیت مزمن دچار می‌شوند را مطرح می کند. نتایج حاصل از آزمایشات توام گاز خردل و پرالیدوکسایم این احتمال را مطرح می‌کند که در درمان علائم کولینرژیک باید از داروهای آنتی کولینرژیک(از جمله آتروپین) استفاده کرد. با این وجود این احتمال را نیز باید در نظر داشت که سایر اکسایم‌ها از جمله ابیدوکسایم و HI-6 ممکن است بتوانند اثر حفاظتی برای آنزیم استیل کولین استراز ایجاد نمایند. همچنین لازم است در مطالعه جداگانه‌ای در آزمایشات درون تن امکان بازیابی خودبخود آنزیم استیل کولین استراز بعد از گذشت زمان طولانی تر و کینتیک مهار آنزیم توسط گاز خردل بررسی گردد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت محترم تحقیقات و فن‌آوری وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی که هزینه اجرای این طرح پژوهشی را تامین کرده است تشکر و قدردانی می شود.

www.SID.ir
Archive of SID

References: منابع

1- Willems JL. Clinical managemnet of mustard gas casualties. Ann Med Militar 1989; Suppl 3: 1-45.

2- Papirmeister B. Med Defense Against Mustard Aas. CRC Press; 1991.

3- Robinson JP, Goldblat J. Chemical Warfare in the Iraq-Iran War. SIPRI Fact Sheet; 1985.

۴- فروتن عباس- یادداشت های پزشکی از جنگ شیمیائی. مجله پزشکی کوثر. ۱. ۹۱-۹۷، ۱۳۷۵.

۵- چراغعلی عبدالمجید . پیشگیری و درمان عوارض ناشی از سلاحهای شیمیائی. دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...- ۱۳۷۹

۶- چراغعلی عبدالمجید. آیا گاز خردل کارسینوژن است؟ مجله پزشکی کوثر. ۴. ۵۸- ۶۲، ۱۳۷۸

7- Boyd A E, Marnett AB, Wong L, et al. Probing the Active Center Gorge of acetylcholinesterase by fluorophores linked to substituted cysteines. J Biol Chem 2000; 275: 22401-8.

8- Lanks A. Sulfur mustard induced neurite extension and acetylcholinesterase synthesis in cultured neuroblastoma cells. Exp Cell Res 1975; 93: 1-9.

9- Vojvodic E. The protective effect of different drugs in rats poisoned by sulfur and nitrogen mustards. Fund Appl Toxicol 1985; 5: s-160-8.

۱۰- مرزبان راد سعید . تغییرات کولین استراز در مسمومیت گاز خردل (در مقایسه با گاز اعصاب) و اهمیت سیر استیل کولین استراز به عنوان راهنما در پیش آگهی وضعیت بالینی بیماران. خلاصه مقالات سمینار تخصصی بررسی عوارض دیرررس گازهای شیمیائی جنگی- ۱۳۷۵

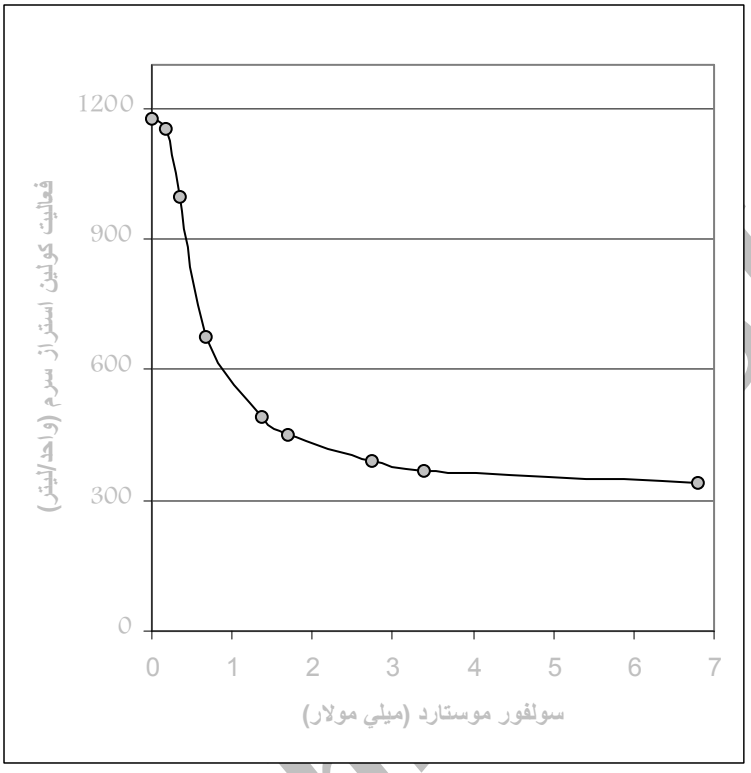
11- Lawson AA, Barr RD. Acethylcholinesterase in red blood cells. Am J Hematol 1987; 26: 101–12.

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

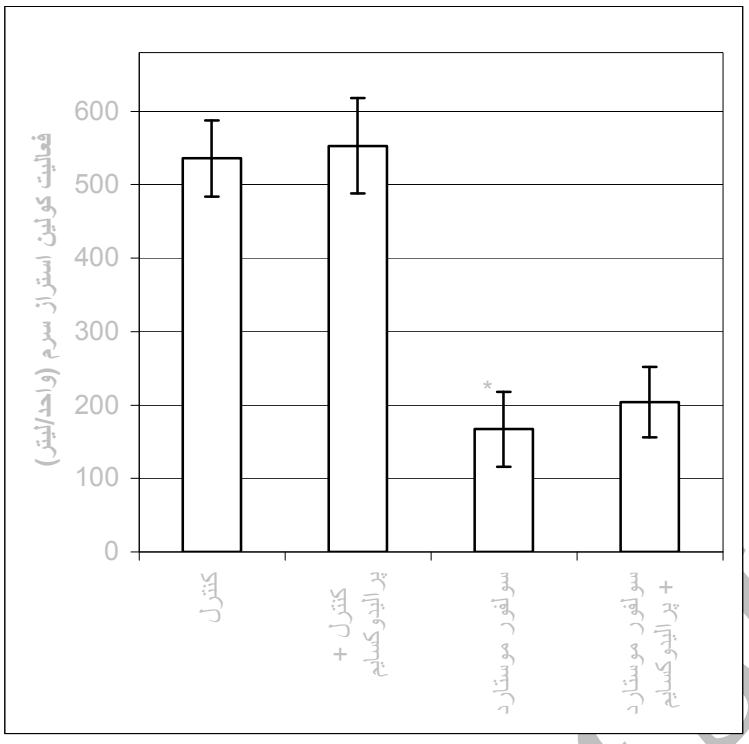
www.SID.ir



نمودار شماره ۱ – فعالیت آنزیم کولین استراز سرم انسان در مقابل غلظت های مختلف خردل گوگردی. نتایج میانگین ٤ آزمون متفاوت است.

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار شماره ۲ – فعالیت آنزیم کولین استراز سرمی در حضور خردل گوگردی (سولفور موستارد) و بازیابی مجدد آنزیم توسط پارالیدو اکسیم. گروه کنترل، آنزیم در حضور پرالیدوکسایم، آنزیم در حضور سولفور موستارد و آنزیم در حضور سولفور موستارد و پرالیدوکسایم. داده ها میانگین ٤ آزمون متفاوت و خطای معیار آن است.

* در حضور سولفور موستارد فعالیت آنزیم کاهش معنی داری دارد و با حضور پرالیدوکسایم فعالیت بازیابی نشده است ($p < 0.005$).

[1]۱- دکترای ویروس شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

Archive of SID

www.SID.ir