

اثر سولفور موستارد و سیکلوفسفامید بر بقاء سلولی در محیط کشت و نقش پیش گیرانه ویتامین E

کاظم احمدی^۱ Ph.D. و فاطمه عرب سلمانی^۲ B.Sc.

آدرس مکاتبه: دانشگاه علوم پزشکی بقیه...^{«عج»} - دانشکده پزشکی - گروه ایمنولوژی و مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی تهران - ایران

تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۱۳۸۴/۱۱/۱۸

تاریخ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۴/۱۱/۵

تاریخ اعلام وصول: ۱۳۸۴/۹/۱۴

خلاصه

مقدمه: ماکروفاژهای صفاقی موش در آزمایشگاه برای مدتی زنده می‌مانند. پس از آن تعداد سلول‌های زنده به دلیل کاهش محیط کشت، سوستر یا تولید فاکتورهای مهار کننده و اثر توکسیک نیتریک اکساید کاهش می‌یابد. عوامل آلیله کننده نظیر سولفور موستارد و سیکلوفسفامید با توجه به غلظت مورد استفاده بر سیستم ایمنی و عملکرد ماکروفاژها اثر مهاری دارند. لذا، هدف از این مطالعه تعیین اثر ویتامین E به عنوان یک آنتی اکسیدانت بر دوام بقاء سلول‌های ماکروفاژی در حضور سولفور موستارد و سیکلوفسفامید بود.

مواد و روش کار: در این مطالعه ابتدا موش‌ها را بیهوش نموده و مقدار ۵ میلی لیتر بافر فسفات نمکی (PBS) سرد را به داخل صفاقی تزریق و پس از ماساژ، با کمک پیپت پاستور تعدادی از سلول‌های صفاقی جمع‌آوری گردید. سلول‌ها را سه بار شسته و پس از شمارش سوسپانسیون سلولی به تعداد لازم تهیه شد. تعداد $10^5 \times 1$ سلول در حجم ۰/۲ میلی لیتر محیط کشت کامل به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه اضافه شد. پلیت‌ها ۲ ساعت در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شده و پس از آن به منظور حذف سلول‌های غیر ماکروفاژی سه بار با PBS گرم شسته شدند. مجدداً به سلول‌ها، محیط کشت کامل حاوی لیپوپلی ساکارید (LPS=۳) در حضور یا غیاب سیکلوفسفامید، سولفور موستارد و ویتامین E اضافه شد و در شرایط فوق به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. دوام بقاء سلولی پس از مخلوط کردن با ترین بلو شمارش شد. نیتريت به عنوان اندیکاتوری از نیتريك اكساید بروش گريس اندازه‌گیری شد.

نتایج: نتایج نشان داد، مرگ سلولی با افزایش غلظت سیکلوفسفامید و یا سولفور موستارد افزایش می‌یابد ($P < 0/02$)، در حالی که در حضور ویتامین E تعداد سلول‌های مرده کاهش کمتری دارد ($p < 0/2$)، ویتامین E توانست با تمام غلظت‌های سیکلوفسفامید و سولفور موستارد در ایجاد مرگ سلولی مقابله کند ولی این مقابله در غلظت‌های بالای سولفور موستارد کمتر بود. ویتامین E همچنین باعث کاهش ترشح نیتریک اکساید در محیط کشت در حضور سیکلوفسفامید و سولفور موستارد شد. در حضور ۱۰ میکروگرم سیکلوفسفامید مقدار نیتريت ۵۲۰ نانو مول بوده در حالی که در حضور ویتامین E مقدار آن به ۴۱۰ نانو مول (۲۱/۱۵) درصد کاهش یافته است ($P < 0/05$). ویتامین E توانسته در مقابل تمام غلظت‌های سولفور موستارد مانع اثر افزایشی آن بر ترشح نیتریک اکساید شود. ولی با افزایش غلظت سولفور موستارد، اثر ویتامین E کاهش یافته است، به طوری که در غلظت ۸۰ و ۱۶۰ میکرو مول اثر ویتامین E معنی‌دار نبود ($P < 0/07$).

۲- دانشجوی دوره کارشناسی - دانشگاه علوم پزشکی بقیه...^{«عج»}

۱- دانشیار - دانشگاه علوم پزشکی بقیه...^{«عج»} - نویسنده مسئول

بحث: مرگ سلول‌های ماکروفاژی موش در مدت زمان آنکوباسیون در محیط کشت در حضور سیکلوفسفامید و یا سولفور موستارد می‌تواند وابسته به ترشح نیتریک اکساید باشد. ویتامین E با کاهش ترشح نیتریک اکساید می‌تواند باعث افزایش بقاء سلول‌های ماکروفاژی و کاهش مرگ سلولی شود.

واژه‌های کلیدی: بقاء سلول، ویتامین E، مرگ سلول، سولفور موستارد و سیکلوفسفامید

مقدمه

سیکلوفسفامید یکی از داروهای گروه الکیله کننده است که در سطح وسیعی به‌عنوان داروی ضدسرطان استفاده می‌شود [۱]. نظر به این‌که سرطان با تکثیر لجام گسیخته سلولی همراه است، بنابراین سیکلوفسفامید احتمالاً از طریق مهار تکثیر سلول عمل می‌کند. نیتروژن موستارد که از عوامل الکیله کننده است نیز دارویی ضدسرطان است. اما سولفور موستارد (گاز خردل) که در سولفور با نیتروژن موستارد متفاوت است به دلیل خاصیت طاول‌زایی به‌عنوان یک گاز جنگی مورد استفاده بوده است.

نتایج تجربی و کلینیکی اثرات دوگانه از سیکلوفسفامید را در پاسخ ایمنی نشان می‌دهد [۲]. سیکلوفسفامید باعث ایجاد آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی و جنینی موش [۳، ۴، ۵ و ۶]، سلول‌های ریه و تیموس رت [۷ و ۸] می‌شود. هرچند این دارو دارای خاصیت ضدسرطان خوبی است و باعث کاهش حجم تومور می‌شود ولی دوز اضافه آن معمولاً وضعی را در مکانیسم‌های دفاعی میزبان ایجاد می‌کند. این ضعف معمولاً منجر به مهار پاسخ‌های ایمونولوژی و اغلب باعث رشد عفونت‌های فرصت‌طلب و بعضی مواقع باعث بروز رشد دوباره سرطان می‌شود [۹ و ۱۰]. بنابراین یکی از مکانیسم‌هایی که برای سیکلوفسفامید تعریف می‌شود مرگ سلولی است. هرچند مرگ سلولی ناشی از سیکلوفسفامید را به مرگ برنامه‌ریزی شده (آپوپتوزیس) نسبت می‌دهند [۳، ۴، ۵ و ۶]، ولی نمی‌توان سایر مکانیسم‌ها، نظیر مرگ ناشی از توکسیسیته را نادیده گرفت. در این رابطه گفته شده که نیتریک اکساید می‌تواند علاوه بر خواص آنتی‌باکتریالی و سرطانی بر خود ماکروفاژها نیز اثر سایتوتوکسی‌سیتی [۱۱] و یا کاهش بقاء عمر داشته باشد [۱۲، ۱۳ و ۱۴]. بنابراین تولید نیتریک اکساید علاوه بر اثرات سایتوتوکسیکی و سایتواستاتیک علیه میکروارگانیسم‌های مهاجم و سلول‌های سرطانی اثرات سمی روی سلول تولید کننده و یا سلول‌های مجاور آن دارد. سولفور موستارد نیز

باعث افزایش نیتریک اکساید سنتتاز و سیکلو اکسیژناز - ۲ در نمونه‌های پوستی به‌دست آمده از موش‌هایی شده که به‌طور پوستی با گاز خردل تماس داشتند [۱۵]. همچنین مهار کننده تولید نیتریک اکساید (L-NAME) NitroArginine Methylester با یک مکانیسم مستقل از مهار نیتریک اکساید از اثرات سایتوتوکسی‌سیتی سولفور موستارد جلوگیری نموده است [۱۶]. در حالی که ال-تیو سیترولین { L-Thio Citrulline (L-TC) } آنالوگ دیگری از آرژنین ضمن مهار تولید نیتریک اکساید باعث حفاظت سلول‌های نرونی در محیط کشت شده است [۱۶]. از طرفی به‌نظر می‌رسد، سلول‌های پلی‌مورفو نوکلئر خط اول مسؤولیت آسیب بافتی پس از دریافت عوامل الکیله کننده نظیر سولفور موستارد و سیکلوفسفامید را داشته باشند. در این رابطه Levitt [۱۷] ثابت کرده که غلظت‌های پایین سولفور موستارد حدود ۱۰۰-۲۵ میکرومولار منجر به تحریک اولیه سلول‌های پلی‌مورفونوکلئر در بدن موش شده به‌طوری که این سلول‌ها بعداً در محیط کشت در پاسخ به محرک‌های سلولی انفجار تنفسی قوی‌تری خواهند داشت. البته تحقیق فوق نشان داده که سولفور موستارد در دوزهای بالاتر (۱۰۰-۵۰ میکرومولار) باعث آپوپتوزیس در این سلول‌ها می‌شود.

مطالعات نشان داده است که اکسیدانت‌هایی نظیر رادیکال‌های آزاد عامل آسیب سلولی و سوق دادن سلول‌های منونوکلئر، لنفوسیت‌ها و سلول‌های ماکروفاژی U937 به سمت مرگ برنامه‌ریزی شده (آپوپتوزیس) می‌باشند [۱۸]. Chow و همکاران [۱۹] نیز نشان داده‌اند که متابولیت‌های نیتریک اکساید نظیر نیتريت و نترات عامل ایجاد مت هموگلوبینمیا بوده و احتمالاً از طریق اتصال به بعضی آمین‌ها باعث تشکیل نیتروز آمین‌های کارسینوزنیک می‌شوند. ویتامین E یک آنتی‌اکسیدانت است که باعث شکار رادیکال‌های آزاد از جمله نیتریک اکساید می‌شود [۲۰]. مطالعات کومار نشان داده که

سلول‌ها سوسپانسیون سلولی در محیط ۱۶۴۰ RPMI (Sigma Co.) بدون فنل رد تهیه گردید (۲۷). تعداد 10^5 \times سلول در حجم ۰/۲ میلی لیتر محیط کشت کامل (حاوی ۱۰ درصد Fetal Calf Serum = FCS و آنتی‌بیوتیک به مقدار ۵۰ میکروگرم استرپتومایسین و ۵۰ واحد پنی‌سیلین در میلی‌لیتر) به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه اضافه گردید. سلول‌ها به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. به منظور رهایی از سلول‌های غیرماکروفاژی پس از ۲ ساعت مایع رویی هر چاهک پلیت به آهستگی بیرون ریخته شد و هر چاهک سه بار با PBS گرم به آرامی شسته شد. به هر چاهک حاوی ماکروفاژ (سلول‌های چسبیده به کف پلیت) مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر از محیط کشت کامل ۱۶۴۰ RPMI بدون فنل رد حاوی ۱۰ میکروگرم LPS (Lipopoly Sacharide) اضافه شد [۲۸].

۲- **اضافه کردن سیکلوفسفامید:** به ردیف اول هر پلیت هیچ غلظتی از سیکلوفسفامید اضافه نشد (ردیف کنترل). به بقیه چاهک‌ها غلظت‌های مختلف بین یک میکروگرم تا ۱۰۰ میلی‌گرم در هر میلی لیتر محیط کشت از سیکلوفسفامید اضافه شد ($n=6$). پلیت‌ها ۲۴ ساعت در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. مایع رویی هر چاهک برداشت و پس از سانتریفوژ کردن جهت اندازه‌گیری نیتریک‌اکساید مورد استفاده قرار گرفتند [۲۷]. درصد زنده بودن سلول‌ها نیز در دو نوبت شمارش شد.

۳- **اضافه کردن سولفور موستارد:** به ردیف اول هر پلیت هیچ غلظتی از سولفور موستارد اضافه نشد (ردیف کنترل). به بقیه چاهک‌ها غلظت‌های مختلف بین ۵ میکرومولار تا ۲۰۰ میکرومولار در هر میلی‌لیتر محیط کشت از سولفور موستارد اضافه شد ($n=6$). پلیت‌ها ۲۴ ساعت در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. مایع رویی هر چاهک برداشت و پس از سانتریفوژ کردن جهت اندازه‌گیری نیتریک‌اکساید استفاده شد [۲۷]. درصد زنده بودن سلول‌ها نیز در دو نوبت شمارش شد.

۴- **اضافه کردن سیکلوفسفامید و ویتامین E:** به ردیف اول هر پلیت هیچ غلظتی از ویتامین E و سیکلوفسفامید اضافه نشد (ردیف کنترل). به بقیه چاهک‌ها یک غلظت ثابت ۱۰۰ میکروگرم

Trolox یکی از آنالوگ‌های محلول در آب ویتامین E باعث دوام بقاء پس از آلودگی استنشاقی به خردل شده و منجر به کاهش اکسیداسیون لیپید می‌شود [۲۱ و ۲۲]. بعضی از مطالعات نشان داده که ویتامین E فعالیت سیکلواکسیژناز را در ماکروفاژها مهار می‌کند [۲۳]. ویتامین E همچنین باعث افزایش بیگانه خواری ماکروفاژها از طریق گیرنده FC شده است [۲۴]. Naghii نیز بر این عقیده است که موادی همچون سلنیوم، مس، روی و آنتی‌اکسیدانت‌هایی نظیر ویتامین E و ویتامین C با افزایش شکارکننده‌های رادیکال‌های آزاد می‌توانند به عنوان محافظ علیه آسیب‌های خردل مفید باشند [۲۵]. گزارشات همچنین نشان داده که ویتامین E در تنظیم سیکلواکسیژناز ماکروفاژها دخیل می‌باشد [۲۶].

بنابراین به نظر می‌رسد، یکی از مکانیسم‌هایی که سولفور موستارد باعث آسیب بافتی می‌شود از طریق رادیکال‌های آزاد بوده و ماکروفاژها که از یک طرف تولیدکننده اصلی رادیکال‌های آزاد بوده و از طرفی تحت تاثیر مکانیسم‌های کنترلی ویتامین E می‌باشند، می‌توانند نقش مهمی در آسیب‌های ناشی از عوامل آلکیله کننده داشته باشند. لذا هدف از این تحقیق آن است که اولاً نقش ماکروفاژها در فرآیند آسیب‌پذیری این عوامل؛ یعنی، اثر این عوامل بر عمل ماکروفاژها از لحاظ تولید نیتریک‌اکساید و مرگ سلولی بررسی شود. ثانیاً نقش ویتامین E به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت و شکارکننده رادیکال‌های آزاد در ترشح نیتریک‌اکساید و مرگ سلولی ناشی از سیکلوفسفامید و گاز خردل بررسی شود.

مواد و روش کار

۱- **تهیه ماکروفاژ و کشت آن‌ها:** ماکروفاژهای صفاقی از موش‌های سوری تهیه شد. برای این کار مقدار ۸-۵ میلی‌لیتر PBS (Phosphate Buffer Saline) سرد به داخل صفاق هر موش تزریق شد. پس از ماساژ آهسته به منظور رهایش سلول‌ها از جداره صفاق با پیپت پاستور مخصوص سلول‌های صفاقی برداشته و به لوله‌های از قبل آماده بر روی یخ انتقال یافتند. به منظور اجتناب از چسبندگی سلول‌ها تمام مراحل در شرایط روی یخ انجام شد. سلول‌ها ۳ بار با PBS سرد شسته شده و نهایتاً پس از شمارش

جذب نوری (OD)، رنگ تولیدی به وسیله ریدر (micro plate multiscan) در ۵۴۰ نانومتر علیه بلانک قرائت و با استفاده از غلظت‌های مختلف نیتريت سدیم به عنوان منحنی استاندارد مقدار نیتريت بر حسب نانو مولار محاسبه شد.

نتایج

اثر سیکلوفسفامید بر مرگ سلولی: نتایج نشان داد که در حالت عادی با انکوباسیون ۲۴ ساعته تعداد سلول‌های زنده کاهش می‌یابد (جدول ۱ و ۲). مرگ سلولی با افزایش غلظت سیکلوفسفامید زیادتر بود ($P < 0.02$). به طوری که در غلظت ۰/۰۰۱ میکروگرم سیکلوفسفامید مرگ سلول‌های ماکروفاژ از ۲۰ درصد گروه کنترل به ۲۶ درصد رسیده است. حداکثر مرگ ماکروفاژی در حضور ۱۰ میکروگرم سیکلوفسفامید ایجاد شده به طوری که مرگ سلولی از ۲۰ درصد گروه کنترل به ۵۴ درصد رسیده است (افزایش ۳۴ درصدی) ($P < 0.05$). در غلظت‌های بالاتر سیکلوفسفامید درصد مرگ سلولی افزایش کمتری داشته به طوری که در حضور ۱۰۰ میکروگرم ۳۲ درصد و در حضور ۲۰۰ میکروگرم ۳۸ درصد افزایش نشان می‌دهد (جدول ۱). جدول ۱ همچنین نشان می‌دهد که وقتی غلظت سیکلوفسفامید به ۱۰۰ و ۲۰۰ واحد افزایش می‌یابد مقدار افزایش مرگ سلولی در مقایسه با ۱۰ میکروگرم تفاوت معنی‌داری نداشته است.

در حضور ویتامین E و بدون سیکلوفسفامید (گروه کنترل) مرگ سلول‌های ماکروفاژی ۱۲ درصد بوده است در حالی که در گروه کنترل بدون ویتامین E میزان مرگ سلولی ۲۰ درصد بوده است. جدول ۱ و نیز شکل ۱ نشان می‌دهد که با افزایش مقدار سیکلوفسفامید در حضور مقدار ثابت ۱۰۰ واحد ویتامین E میزان مرگ سلولی در مقایسه با گروه کنترل (ویتامین E بدون سیکلوفسفامید) افزایش داشته ولی در مقایسه با گروه ۱ افزایش مرگ سلولی کمتر بوده است ($P < 0.05$). به طوری که در حضور ۱۰ میکروگرم سیکلوفسفامید بدون ویتامین E مقدار افزایش مرگ سلولی در مقایسه با گروه کنترل از ۲۰ درصد به ۵۴ درصد افزایش یافته

ویتامین E به ازای هر میلی لیتر محیط کشت اضافه شد و به همین چاهک‌های حاوی ویتامین E غلظت‌های مختلف سیکلوفسفامید بین یک میکروگرم تا ۱۰۰ میلی گرم در هر میلی لیتر محیط کشت اضافه شد ($n=6$). پلیت‌ها ۲۴ ساعت در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. مایع رویی هر چاهک برداشت و پس از سانتریفوژ کردن جهت اندازه‌گیری نیتريك اکساید مورد استفاده قرار گرفتند [۲۷]. درصد زنده بودن سلول‌ها نیز شمارش شد.

۵- اضافه کردن سولفور ماستارد و ویتامین E: به ردیف اول هر پلیت هیچ غلظتی از ویتامین E و سولفور ماستارد اضافه نشد (ردیف کنترل). به بقیه چاهک‌ها یک غلظت ثابت ۱۰۰ میکروگرم ویتامین E به ازای هر میلی لیتر محیط کشت اضافه شد و به همین چاهک‌های حاوی ویتامین E غلظت‌های مختلف سولفور ماستارد بین ۵ میکرومولار تا ۲۰۰ میکرومولار در هر میلی لیتر محیط کشت اضافه شد ($n=6$). پلیت‌ها ۲۴ ساعت در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. مایع رویی هر چاهک برداشت و پس از سانتریفوژ کردن جهت اندازه‌گیری نیتريك اکساید استفاده شد [۲۷]. درصد زنده بودن سلول‌ها نیز شمارش شد.

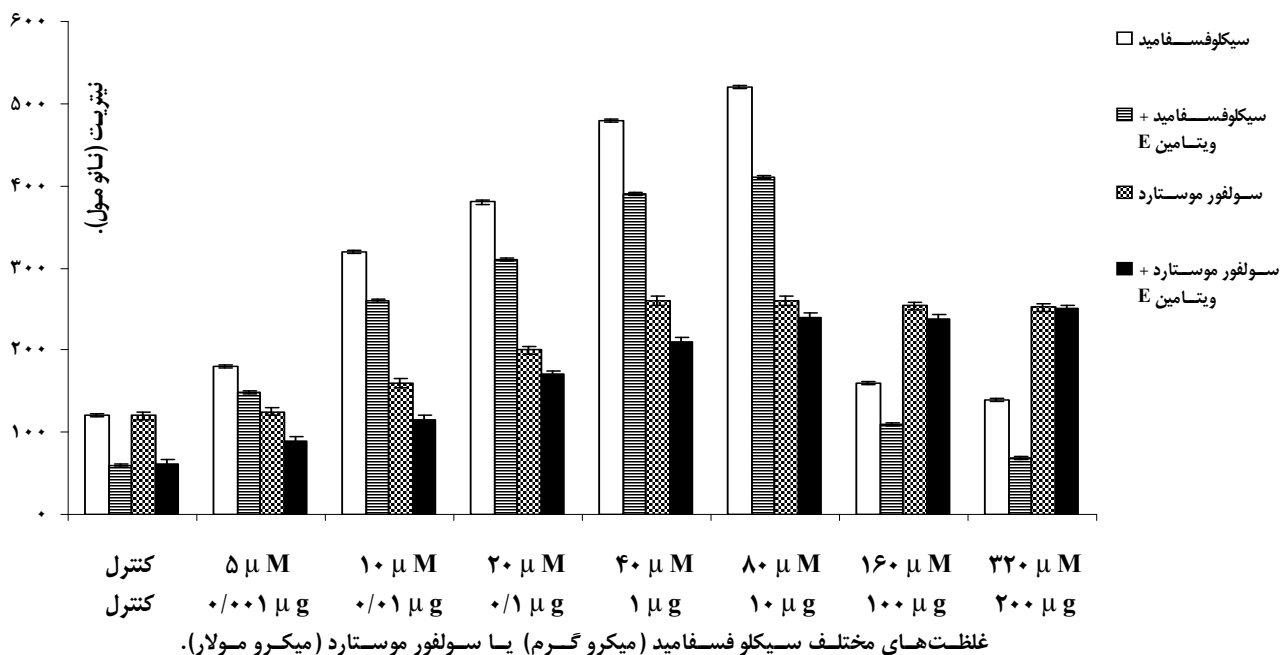
۶- شمارش سلول‌های زنده: پس از برداشت مایع رویی به چاهک‌های خالی از مایع رویی مقدار ۰/۱ میلی لیتر PBS سرد با فشار اضافه شد. به مدت چند دقیقه تکان ملایم داده شد تا سلول‌ها از ته پلیت کنده شدند. مقدار ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با هم حجم آن از ترین بلو مخلوط و با میکروسکوپ نوری تعداد درصد سلول‌های زنده در ۶ میدان میکروسکوپی شمارش شد ($n=6$).

۵- اندازه‌گیری نیتريك اکساید: نیتريك اکساید ماده‌ای است بسیار ناپایدار و سریعاً به نیتريت و نیترات تبدیل می‌شود. لذا مقدار نیتريت به عنوان اندیکاتور از نیتريك اکساید به روش گریس اندازه‌گیری شد [۲۷]. به طور خلاصه مقدار ۵۰ میکرولیتر از مایع رویی هر چاهک با ۵۰ میکرولیتر از ماده گریس

N-1- 0.1% Sulphanilamid, 1% 2.5% Naphtylethylenediamine hydrochloride و (PO4H3) مخلوط و پس از ۱۰ دقیقه انکوبه شدن در حرارت اتاق

می‌دهد که افزایش غلظت سیکلوفسفامید به مقدار ۱۰۰ و ۲۰۰ واحد تفاوت معنی‌داری در میزان مرگ سلولی در مقایسه با ۱۰ میکروگرم ایجاد نمی‌کند.

است. در حالی که در همین غلظت سیکلوفسفامید در حضور ۱۰۰ واحد ویتامین E، مرگ سلولی در مقایسه با گروه کنترل از ۱۲ درصد به ۳۶ درصد افزایش یافته است ($P < 0.05$). جدول ۱ همچنین نشان



شکل ۱: مقایسه مقدار نیتریک اکساید مترشحه توسط ماکروفاژهای صفاقی موش در پاسخ به غلظت‌های مختلف سیکلوفسفامید، سولفور موستارد در حضور یا عدم حضور ویتامین E.

جدول ۱: درصد مرگ سلولی ماکروفاژهای صفاقی موش در پاسخ به غلظت‌های مختلف سیکلوفسفامید و درصد افزایش نیتريت در مقایسه با گروه کنترل در حضور یا عدم حضور ۱۰۰ واحد ویتامین E.

گروه سیکلوفسفامید + ۱۰۰ واحد ویتامین E (گروه ۲)			گروه سیکلوفسفامید (گروه ۱)		
درصد مرگ سلولی	درصد کاهش نیتريت در مقایسه با گروه بدون ویتامین E	سیکلوفسفامید (میکروگرم) و ۱۰۰ واحد ویتامین E	درصد مرگ سلولی	درصد افزایش نیتريت در مقایسه با گروه کنترل بدون سیکلوفسفامید	سیکلوفسفامید (میکروگرم)
۱۲	۵۰	کنترل	۲۰	۰۰	کنترل
۲۲	۱۷/۷۷	۰/۰۰۱	۲۶	۵۰	۰/۰۰۱
۲۸	۱۸/۷۵	۰/۰۱	۳۴	۱۶۶/۶۶	۰/۰۱
۳۲	۱۸/۴۲	۰/۱	۴۲	۲۱۶/۶۶	۰/۱
۳۸	۱۸/۷۵	۱	۵۲	۳۰۰	۱
۳۶	۲۱/۱۵	۱۰	۵۴	۳۳۳/۳۳	۱۰
۴۰	۳۱/۲۵	۱۰۰	۵۲	۳۳/۳۳	۱۰۰
۴۲	۵۱/۴۲	۲۰۰	۵۸	۱۶/۶۶	۲۰۰

نانومول رسید (افزایش ۳۳۳/۳۳ درصدی، $P < 0.05$) (جدول ۱). غلظت‌های بالاتر از ۱۰ میکروگرم سیکلوفسفامید افزایش کمتری در سطح نیتريت ایجاد کرد به طوری که در حضور ۱۰۰ میکروگرم و ۲۰۰

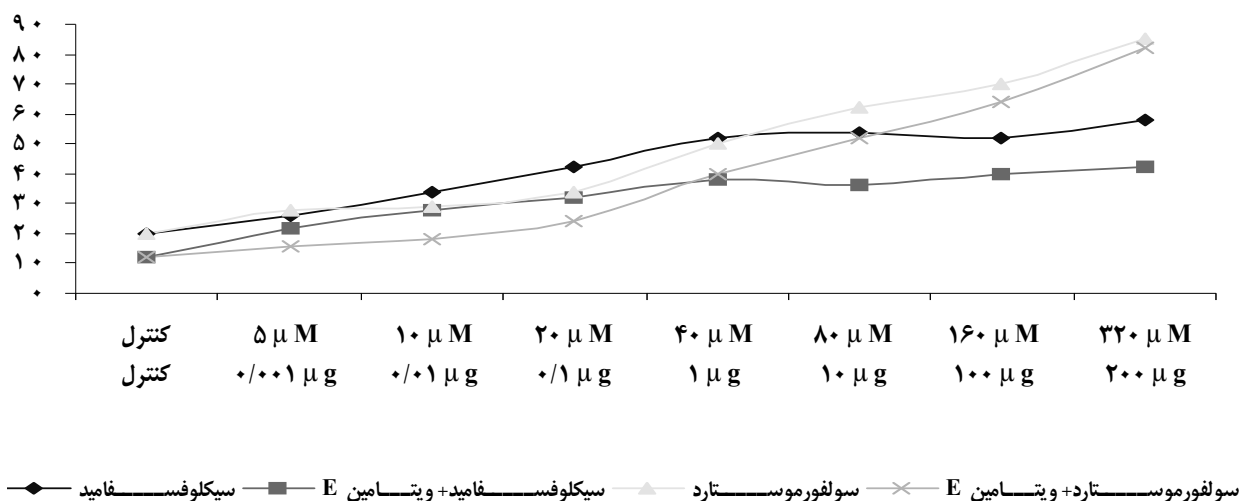
نیتريك اكساید: شكل ۲ نشان می‌دهد که حداکثر ترشح نیتريك اكساید در ۲۴ ساعت در حضور ۱۰ میکروگرم سیکلوفسفامید به دست آمد به طوری که مقدار آن از ۱۲۰ نانومول در چاهک کنترل به ۵۲۰

در حضور ویتامین E مقدار آن به ۴۱۰ نانومول کاهش یافته است (کاهش ۲۱/۱۵ درصد، $P < 0.05$).

۲- اثر سولفور موستارد بر مرگ سلولی: نتایج به دست آمده از اثر سولفور موستارد نشان داد که این ماده در حالت وابسته به دوز باعث مرگ سلولی شده است. حداقل افزایش مرگ سلولی در مقایسه با گروه کنترل پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در محیط کشت در پاسخ به ۵ میکرو مول سولفور موستارد به دست آمد که برابر با ۲۸ درصد بود (جدول ۲). افزایش مرگ سلولی در پاسخ به غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میکرومول در مقایسه با ۵ میکرومول معنی‌دار نبود. حداکثر مرگ سلولی در پاسخ به ۲۰۰ میکرومول به دست آمد.

میکروگرم به ترتیب افزایشی برابر ۳۳/۳۳ درصدی و ۱۶/۶۶ درصدی در مقایسه با گروه کنترل به وجود آمد.

در حالی که در حضور ویتامین E مقدار نیتريت در مقایسه با حالت بدون ویتامین E از افزایش کمتری برخوردار بوده است. به عبارتی ویتامین E باعث کاهش نیتريت شده است. مثلاً در شکل ۲ در گروه کنترل مقدار نیتريت برابر با ۱۲۰ نانومول بوده است، در حالی که در حضور ۱۰۰ واحد ویتامین E مقدار آن برابر با ۶۰ نانومول بوده است. (کاهش ۵۰ درصدی، $p < 0.05$). مقایسه گروه‌ها در جدول ۱ نشان می‌دهد که ویتامین E باعث کاهش ترشح نیتريك اکساید در محیط کشت در برابر سیکلوفسفامید شده است. در شکل ۱ در حضور ۱۰ میکروگرم سیکلوفسفامید مقدار نیتريت ۵۲۰ نانومول بوده در حالی که



شکل ۲: مقایسه مرگ سلولی در پاسخ به سیکلوفسفامید، سولفور موستارد در حضور یا عدم حضور ویتامین E.

جدول ۲: درصد مرگ سلولی ماکروفاژهای صفاقی موش در پاسخ به غلظت‌های مختلف سولفور موستارد و در صد افزایش نیتريت در مقایسه با گروه کنترل در حضور یا عدم حضور ۱۰۰ واحد ویتامین E.

گروه سولفور موستارد + ۱۰۰ واحد ویتامین E (گروه ۲)			گروه سولفور موستارد (گروه ۱)		
درصد مرگ سلولی	درصد کاهش نیتريت در مقایسه با گروه بدون ویتامین E	سیولفور موستارد (میکرومول) و ۱۰۰ واحد ویتامین E	درصد مرگ سلولی	درصد افزایش نیتريت در مقایسه با گروه کنترل (بدون سولفور موستارد)	سولفور موستارد (میکرومول)
۱۲	۴۸/۳۳	کنترل	۲۰	۰۰	کنترل
۱۶	۲۸	۵	۲۸	۴/۱۶	۵
۱۸	۲۸/۱۲	۱۰	۲۹	۳۳/۳۳	۱۰
۲۴	۱۵	۲۰	۳۴	۶۶/۶۶	۲۰
۴۰	۱۹/۲۳	۴۰	۵۰	۱۱۶/۶۶	۴۰
۵۲	۷/۶۹	۸۰	۶۳	۱۱۶/۶۶	۸۰
۶۴	۶/۲۹	۱۶۰	۷۰	۱۱۱/۶۶	۱۶۰
۸۲	۰/۷۹	۳۲۰	۸۵	۱۱۰	۳۲۰

گروه کنترل که فاقد ویتامین E بود درصد مرگ سلولی به ۲۰ درصد رسیده است. این موضوع نشان می‌دهد که با گذشت زمان انکوباسیون، سلول‌ها در محیط کشت، دچار مرگ می‌شوند. مرگ سلولی می‌تواند علل مختلفی داشته باشد که یکی از آن‌ها وجود نیتریک‌اکساید است. سیکلوفسفامید و سولفور موستارد هر دو به‌صورت وابسته به دوز باعث افزایش ترشح نیتریک‌اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی موش در محیط کشت شدند. این نتایج با یافته‌های دیگران مطابقت دارد. Sawyer نشان داده که چنانچه ال-تیوسیتروپین یک ساعت قبل از گاز خردل به کشت سلولی اضافه شود، ۸۰۰ درصد و در صورتی که ۲۴ ساعت قبل از آن اضافه شود ۱۵۰۰ درصد حفاظت علیه گاز خردل به‌وجود می‌آورد [۱۶]. او همچنین در یک مطالعه دیگری ثابت کرده که چنانچه کشت سلول‌های عصبی جنینی جوجه قبل از دریافت گاز خردل در معرض مهارکننده نیتریک‌اکساید سنتتاز (LNAME) قرار گیرند در مسیری مستقل از نیتریک‌اکساید در مقابل مرگ سلولی ناشی از گاز خردل حفاظت خواهند شد [۲۹]. در این رابطه Arroyo طی مطالعه‌ای بر روی فیبروبلاست‌های انسانی ثابت کرده که تحریک سلول‌ها با ۱۰ میکرو مولار سولفور موستارد در محیط کشت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت، باعث افزایش ۵ برابری ترشح اینترلوکین-۶ و افزایش ۱۰ برابری ترشح اینترلوکین-۸ شده است [۳۰] که نشان دهنده اثر گاز خردل بر اعمال سلول‌ها می‌باشد. با توجه به این‌که سایتوکاین‌ها مولکول‌هایی هستند که معمولاً اعمال سایر سلول‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهند. بنابراین اثر گاز خردل با اثر بر ترشح سایتوکاین‌ها می‌تواند زمینه استعداد میزبان را به عفونت‌ها، سرطان و بیماری‌های خود ایمنی افزایش دهد. با توجه به این‌که اینترلوکین-۶ در فرآیند التهاب نقش مهمی دارد. می‌توان بخشی از عوارض گاز خردل را به برهم خوردن نظم ترشح سایتوکاین‌ها نسبت داد. در حضور غلظت کمتر از یک میکرومولار ویتامین D (1-alpha-25(OH)2D3 تولید و ترشح این دو سایتوکاین به‌ترتیب ۴ و ۵ برابر کاهش داشته است [۳۰]. در عوض (1-alpha-25(OH)2D3 باعث افزایش تکثیر سلول‌های کراتینوسایت انسانی پس از دریافت سولفور

نتایج حاصل از ویتامین E نشان داد که در گروه کنترل بدون ویتامین E و بدون سولفور موستارد درصد مرگ سلولی برابر با ۲۰ بوده (جدول ۲) که این مقدار در حضور ۱۰۰ واحد ویتامین E به ۱۲ درصد کاهش یافته است. به‌عبارتی ویتامین E باعث کاهش مرگ سلولی ایجاد شده توسط سولفور موستارد شده است. درصد مرگ سلولی در حضور ۵ میکرو مول سولفور موستارد و ۱۰۰ واحد ویتامین E از ۲۸ درصد به ۱۶ درصد کاهش یافته است. ویتامین E توانسته با تمام غلظت‌های سولفور موستارد مقابله نموده و اثر کشندگی آن را بر ماکروفاژها کاهش دهد (شکل ۲ و جدول ۲).

نیتریک‌اکساید: نتایج حاصل از اثر سولفور موستارد بر ترشح نیتریک‌اکساید در حضور یا غیاب ویتامین E نشان داد که سولفور موستارد در حالت وابسته به‌غلظت باعث افزایش نیتریک‌اکساید شده است. حداقل افزایش در پاسخ به ۵ میکرو مول به‌دست آمد که برابر با ۴/۱۶ درصد بود (جدول ۲). افزایش نیتریک‌اکساید در پاسخ به غلظت‌های بالاتر از ۸۰ میکرومول سولفور موستارد معنی‌دار نبود (شکل ۱) ($P < 0.02$) نتایج حاصل از اثر ویتامین E نشان داد که ویتامین E توانسته باعث کاهش اثر سولفور موستارد بر ترشح نیتریک‌اکساید شود (جدول ۲ و شکل ۱). ویتامین E توانسته در مقابل تمام غلظت‌های سولفور موستارد مانع اثر افزایشی آن بر ترشح نیتریک‌اکساید شود. ولی هر چه غلظت سولفور موستارد افزایش یافته اثر ویتامین E کاهش یافته است، به‌طوری‌که در غلظت ۸۰ و ۱۶۰ میکرومول اثر ویتامین E معنی‌دار نبود (جدول ۲ و شکل ۱) ($P < 0.02$). حداقل اثر ویتامین E در مقابله با سولفور موستارد بر ترشح نیتریک‌اکساید در پاسخ به ۳۲۰ میکرومول سولفور موستارد به‌دست آمد (شکل ۱ و جدول ۲).

بحث

نتایج به‌دست آمده در این تحقیق نشان می‌دهد که ماکروفاژها را برای زمان محدودی می‌توان در آزمایشگاه و در محیط کشت زنده نگهداری کرد. به‌طور مثال پس از تهیه ماکروفاژهای صفاقی و قبل از کشت درصد مرگ سلولی ۳-۴ درصد بود که پس از ۲۴ ساعت در

در تمام دوزهای سیکلوفسفامید و سولفور موستارد استفاده شده اختلاف مرگ سلولی در حضور ویتامین E معنی دار نبوده است ($P < 0.02$). در همین تحقیق نتایج نشان داد که سیکلوفسفامید و سولفور موستارد هر دو باعث افزایش ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی موش شده و حداکثر افزایش در پاسخ به ۱۰ میکروگرم سیکلوفسفامید و ۱۶۰ میکرومولار سولفور موستارد به دست آمده است. غلظت‌های بالاتر سیکلوفسفامید باعث مهار ترشح نیتریک اکساید شده است، در حالی که غلظت‌های بالاتر از ۱۶۰ میکرومولار سولفور موستارد در مقایسه با غلظت‌های پایین‌تر اختلاف معنی‌داری در ترشح نیتریک اکساید به وجود نیاورد، ولی افزایش مرگ سلولی را به دنبال داشت.

ویتامین E باعث کاهش اثر سیکلوفسفامید و سولفور موستارد بر ترشح نیتریک اکساید شده ولی قادر به مهار کامل آن نبوده است. همان‌طور که در شکل ۱ و ۲ در گروه کنترل دیده می‌شود ویتامین E بدون حضور عوامل آلکیله کننده باعث کاهش ترشح نیتریک اکساید شده است. نتایج این مطالعه حاکی از آن است که ویتامین E هم باعث کاهش ترشح نیتریک اکساید و هم باعث کاهش مرگ سلولی می‌شود. از طرفی گاز خردل و سیکلوفسفامید هم باعث افزایش ترشح نیتریک اکساید (در غلظت‌های کمتر از ۱۰ میکروگرم سیکلوفسفامید) و هم باعث افزایش مرگ سلولی می‌شوند (در تمام غلظت‌ها). لذا به نظر می‌رسد که باید رابطه‌ای بین مقدار نیتریک اکساید مترشح و مرگ سلولی وجود داشته باشد. در این رابطه Assreuy [۱۱] ثابت کرده که ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژها در محیط کشت تا زمانی که سلول‌ها زنده هستند ادامه می‌یابد و کاهش ترشح آن‌ها در محیط کشت می‌تواند به دلیل اثر فیدبک منفی نیتریک اکساید بر سلول تولید کننده آن باشد. از طرفی Albina و Drapier نیز گفته‌اند که کاهش ترشح نیتریک اکساید می‌تواند به دلیل مرگ ماکروفاژها باشد. Chow و همکارانش [۱۹] نیز ثابت کرده‌اند که نیتریک اکساید موجود در محیط کشت می‌تواند عاملی در تسریع مرگ سلولی باشد. ویتامین E با کاهش تشکیل پراکسی‌نیتريت موجب بقاء سلول می‌شود. آن‌ها همچنین ثابت کرده‌اند که رادیکال‌های آزاد عامل آسیب سلولی و سوق دادن سلول‌های مونوکلتر لنفوسیت‌ها و

موستارد شده است. یافته‌های این تحقیق نشان داد که سولفور موستارد در محیط کشت در حالت وابسته به دوز باعث افزایش مرگ سلولی شده است. با توجه به این که بعضی از مطالعات نشان دهنده آن است که نیتریک اکساید می‌تواند مسئول بخشی از مرگ سلول تولید کننده آن باشد و نظر به این که سولفور موستارد از یک طرف باعث افزایش ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژها شده است و از طرفی افزایش مرگ سلولی را به دنبال داشته است، می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً سولفور موستارد از طریق افزایش ترشح نیتریک اکساید مسئول مرگ سلول‌های ماکروفاژی می‌باشد. در تایید نتایج ما در این تحقیق Amir و همکارانش با اثر سولفور موستارد بر سلول‌های ماکروفاژی موش (J774) در محیط کشت متوجه شدند که سولفور موستارد در حالت وابسته به دوز باعث مرگ سلول شده و حداکثر مرگ سلولی پس از ۲۴ ساعت حاصل شده است [۳۱]. Amir و همکارانش [۳۲] همچنین در تحقیق جداگانه‌ای بر روی سلول‌های J774 نشان دادند که سولفور موستارد در حالت وابسته به دوز باعث افزایش مرگ سلولی شده است [۳۲]. آن‌ها همچنین ثابت کردند که مرگ سلولی در پاسخ به سولفور موستارد با کاهش گلوکاتایون همراه بوده است و درمان اولیه با گلوکاتایون قبل از آن که در معرض گاز خردل قرار گیرند افزایش ۳-۲ برابری سلول‌های زنده را پس از ۲ ساعت آلودگی با خردل به دنبال داشته است.

در این تحقیق اثر ویتامین E بر دوام بقاء سلولی در حضور سیکلوفسفامید و سولفور موستارد نیز بررسی شد. مطالعه نشان داد که هر دو عامل آلکیله کننده سیکلوفسفامید و خردل در یک حالت وابسته به دوز باعث افزایش مرگ سلولی شده‌اند. این مرگ سلولی در حضور ویتامین E و بدون اضافه کردن سیکلوفسفامید و سولفور موستارد (گروه کنترل) کاهش یافته و در گروه‌هایی که تحت دوزهای مختلف سیکلوفسفامید و سولفور موستارد قرار گرفتند، نیز ویتامین E باعث کاهش مرگ سلولی شده است. اثر ویتامین E بر بقاء عمر سلول کمتر از اثر کشندگی (مرگ سلولی) سیکلوفسفامید و سولفور موستارد بوده است. به عبارتی ویتامین E قادر نبوده است اثر زیان‌آور سیکلوفسفامید و سولفور موستارد بر سلول را کاملاً مهار و آن‌را در حد گروه کنترل نگهدارد ولی توانسته آن‌را محدود کند. البته

افزایش ترشح نیتریک‌اکساید توسط ماکروفاژها در حضور این عوامل می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً بخشی از اثر مرگ سلولی تحت تاثیر عوامل آلکیله کننده فوق (حداقل در غلظت‌های پایین) از طریق افزایش ترشح نیتریک‌اکساید و تشکیل پراکسی‌نیتريت صورت می‌گیرد. از طرفی با توجه به نقش مثبت ویتامین E در مهار ترشح نیتریک‌اکساید و کاهش مرگ سلولی ناشی از عوامل آلکیله کننده فوق به نظر می‌رسد که با استفاده از ویتامین E می‌توان بخشی از عوارض زودرس گاز خردل و سیکلوفسفامید را کاهش داد.

تشکر و قدردانی

از دانشکده پزشکی به جهت در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی و همچنین دانشجویان کارشناسی ارشد میکروبی‌شناسی که در این پروژه با کمک در تهیه سلول، ما را یاری کردند تشکر به عمل می‌آید.

ماکروفاژها به سمت مرگ سلولی می‌باشند. در تایید این نظریه Galli و همکارانش [۱۸] نشان داده‌اند که رادیکال‌های آزاد باعث آسیب بافتی در سلول‌های U937 شده و ویتامین E به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت موجب محافظت سلول‌ها در برابر مرگ می‌شود. مطالعات دیگر توسط Saito و همکارانش [۳۳] نشان داده که در فقدان سلنیوم مرگ سلولی افزایش یافته و ویتامین E اثرات فقدان سلنیوم را کاهش داده و باعث افزایش بقاء سلولی شده است. Poliandoil و همکارانش [۳۴] نیز رابطه رادیکال‌های آزاد و کادمیوم را نشان داده و ثابت نموده‌اند که کادمیوم مرگ سلولی را افزایش داده و ویتامین E باعث مهار آسیب‌های ایجادی توسط کادمیوم می‌شود. با توجه به اثر کشندگی سولفور موستارد و سیکلوفسفامید بر ماکروفاژها و افزایش مرگ سلولی در محیط کشت از یک طرف و

منابع

- 1- Tzai TS, Lin JS, and Chew NH. Modulation of antitumor immunity of tumor-bearing mice with low dose cyclophosphamide. *J Surg Res* 1996; 65:139-44.
- 2- Tosa N, Murakami M, Jia WY, Yokoyama M, Masunaga T, Iwabuchi C, et al. Critical function of T cell death-associated gene 8 in glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis. *International Immunology* 2003;15(6):741-9.
- 3- Meyn RE, Stephens NR, Hunter L, and Milas L. Induction of apoptosis in murin tumors by cyclophosphamide. *Cancer Chemother Pharmacol* 1994;33:410-14.
- 4- Nomura M, Suzuki M, Suzuki Y, Ikeda H, Tamura J, Koike M, et al. Cyclophosphamide-induced apoptosis induced phocomelia in the mouse. *Arch Toxicol* 1996;70: 672-7.
- 5- Chen B, Cyr DG, and Hales BF. Role of apoptosis in mediating phosphamide mustard-induced rat embryo malformations in vitro. *Teratology* 1994;50:1-12.
- 6- Moallem SA, and Hales BF. Induction of apoptosis and cathepsin D in limbs exposed in vitro to an activated analog of cyclophosphamide. *Teratology* 1995; 52: 3-14.
- 7- Sulkowska M, and Sulkowski S. Apoptosis-like changes in the lung induced by cyclophosphamide and papain: 1. An Ultrastructural study. *J Submicroscopic Cytology and pathology* 1998;30:105-16.
- 8- Wang GJ, and Cai L. Relatively Low-dose cyclophosphamide is likely to induce apoptosis cell death in rat thymus through Fas/Fas ligand pathway. *Mutation Research* 1999;427:125-33.
- 9- Diasio RB, and Lo Buglio AF. Immunomodulators: immunosuppressive agents and immunostimulants. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Rudd RW, editors. *Goodman and Gilman'S The pharmacological Basis of Therapeutics*. New York: McGraw-Hill; 2003.p.1291-308.
- 10- Matar P, Rozados VR, Gonzalez AD, Dlugovitzky DG; Bonfil RD, and Scharovsky OG. Mechanism of anti metastatic immunopotentiality by low dose cyclophosphamide. *European Journal of cancer (Part A)* 2000;36(8):1060-6.
- 11- Assrey J, Cunha FQ, Liew FY, and Moncada S. Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. *Br J pharmacol* 1993;108: 833-7.
- 12- Albina JE, Caldwell MD, Henry WL, Mills CD; Regulation of Macrophage functions by L-arginine. *J Exp Med* 1989a;169:1021-109.
- 13- Albina JE, Mills CD, Henry WL, and Caldwell MD; Regulation of macrophage physiology by L-arginine: Role of the oxidative L-arginine deiminase pathway. *J Immunol* 1989b;143:3641-6.
- 14- Drapier JC, Hibbs JB Jr; Murine cytotoxic activated macrophages inhibit aconitase in tumor cells. Inhibition involves the ion-sulphur prosthetic group and is reversible. *J Clin Invest* 1986;78(3):790-7.
- 15- Nyska A, Lomnitski L, Maronpot R, Moomaw C, Brodsky B, Sintov A, and Wormser U. Effects of iodine on inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in sulfur mustard-induced skin. *Arch Toxicol* 2001;74(12):768-74.
- 16- Sawyer TW, Hancock JR, and D'Agostino PA. I-thiocitrulline: A potent protective agent against the toxicity of sulphur mustard in vitro. *Toxicol Appl pharmacol* 1998;151(2): 340-6.
- 17- Levitt JM, Lodhi IJ, Nguyen PK, Ngo V, Clift R, Hinshaw DB, et al. Low-dose sulfur mustard primes oxidative function and induces apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes. *Int Immunopharmacol* 2003;3(5):747-56.

- 18- Galli F, Ghibelli L, Buoncristiani U, Bordoni V, D'Intini V, Benedetti S, et al. Mononuclear leukocyte apoptosis in haemodialysis patients: the role of cell thiols and vitamin E. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18(8):1592-600.
- 19- Chow CK, and Hong CB. Dietary vitamin E and selenium and toxicity of nitrite and nitrate. *Toxicology* 2002;180(2):195-207.
- 20- Nakayma T, Kodama M, Nagata C. Free radical formation in DNA by lipid peroxidation. *Agric Biol Chem* 1984;48:571-8.
- 21- Kumar O, Sugendran K, Vijayaraghvan R. Protective effect of various antioxidants on the toxicity of sulphur administered to mice by inhalation or percutaneous routes. *Chemico-Biological Interactions* 2001;34:1-12.
- 22- Lakshaman Rao PV, Vijayaraghavan R, and Bhaskar ASB. Sulphur mustard induced damage in mice after dermal and inhalation exposure. *Toxicology* 1999;139:39-51.
- 23- Beharka AA, Wu D, Serafini M, and Meydani SN. Mechanism of vitamin E inhibition of cyclooxygenase activity in macrophages from old mice: role of peroxynitrite. *Free Radic Biol Med* 2002;32(6):503-11
- 24- Konjufca VK, Bottje WG, Bersi TK, and Erf GF. Influence of dietary vitamin E on phagocytic functions of macrophages in broilers. *Poult Sci* 2004;83(9):1530-4.
- 25- Naghii MR. Sulfur mustard intoxication, oxidative stress, and antioxidants. *Mil Med* 2001;167(7):573-75.
- 26- Wu D, Hayek MG, and Mevdani S. Vitamin E and macrophage cyclooxygenase regulation in the aged. *J Nutr* 2001;131(2)38:2S-8S.
- 27- Green LC, Wagner DA, Glowgowski J, Skipper PL, Wishnok JJ, And Tannenbaum SS. Analysis of Nitrate, nitrite and $\{^{15}\text{N}\}$ Nitrate in Biological Fluids. *Analytical Biochemistry* 1982;126:131-8.
- 28- Ahmadi-Renani K, and McCrudden AB. Sex differences in macrophage nitric oxide production. *Iranian Journal of Medical Sciences* 1998;23(1&2):42-47.
- 29- Sawyer TW, Lundy PM, and Weiss MT. Protective effect of an inhibitor of nitric oxide synthase on sulphur mustard toxicity in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996;141(1):138-44.
- 30- Arroyo CM, Kan RK, Burman DL, Kahler DW, Nelson MR, Corun CM, Guzman JJ, and Broomfield CA. Regulation of 1-alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 on interleukin-6 and interleukin-8 induced by sulfur mustard (HD) on human skin cells. *Pharmacol Toxicol* 2003;92(5):204-13.
- 31- Amir A, Chapman S, Kadar T, Gozes Y, Sahar R, and Allon N. Sulfur mustard toxicity in macrophages: effect of dexamethasone. *J Appl Toxicol* 2000;1:S51-8.
- 32- Amir A, Chapman S, Gozes Y, Sahar R, and Allon N. Protection by extracellular glutathione against sulfur mustard induced toxicity in vitro. *Hum Exp Toxicol* 1998;17(12):652-60.
- 33- Saito Y, Yoshida Y, Akazawa T, Takahashi K, and Niki F. Cell death caused by selenium deficiency and protective effect of antioxidants. *J Biol Chem* 2003;278(41):39428-34.
- 34- Poliandri AH, Cabilla JP, Velardez MO, Bodo CC, Duvilanski BH. Cadmium induces apoptosis in anterior pituitary cells that can be reversed by treatment with antioxidants. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003;190(1):17-24.