

بررسی اثر محافظتی هگزامتیلن تترامین بر رده سلولی HF2FF تحت تاثیر سولفورمستارد

مهدی صابری^۱ Ph.D.، علی بمان زارعی^۲ Ph.D.، ژیلا پیرزاد^۳ M.Sc.، لیلا گل منش^۴ M.Sc.، حسین ایمانی^۵ Ph.D.، غلامرضا پورحیدری زاده^۶ Ph.D. و مهوش جعفری^۷ Ph.D.

آدرس مکاتبه: * دانشگاه علوم پزشکی بقیه...^۱ - دانشکده پزشکی - گروه فارماکولوژی و سم شناسی و مرکز تحقیقات آسیب های شیمیایی -

تهران - ایران

** دانشگاه علوم پزشکی بقیه...^۲ - دانشکده پزشکی - گروه بیوشیمی و مرکز تحقیقات آسیب های شیمیایی - تهران - ایران

*** دانشگاه علوم پزشکی بقیه...^۳ - دانشکده پزشکی - گروه آناتومی - تهران - ایران

تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۱۳۸۵/۳/۱۱

تاریخ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۵/۲/۷

تاریخ اعلام وصول: ۱۳۸۴/۹/۲۲

خلاصه

مقدمه: سولفورمستارد (HD)، به عنوان یک سلاح شیمیایی بسیار خطرناک همیشه مورد استفاده بوده است. علیرغم تحقیقات گسترده طی چندین دهه هنوز راه کار مناسبی برای پیشگیری یا درمان عوارض HD یافت نشده است.

مواد و روش کار: در این مطالعه رده سلولی HF2FF به عنوان مدلی از سلول های فیبروبلاست پوست انسان برای بررسی اثرات سمی HD و اثر محافظتی هگزامتیلن تترامین (HMT) در مقابل HD مورد استفاده قرار گرفت. روش های رنگ آمیزی ویوله ژانسیان (Gentiana violet =GV) و قرمز خنثی (Neutral Rd= NR) برای تعیین میزان سلول های زنده (Viability) به عنوان معیار مهم ارزیابی به کار گرفته شدند. توانایی اثر محافظتی HMT در پیش گیری از اثر خردل (Lethal concentration₅₀= LC)، در حالات مختلف تعیین گردید.

نتایج: استفاده از غلظت های مختلف HD نشان داد، با افزایش غلظت به بیش از ۳۰ میکرومولار اثرات سمی به سرعت در سلول ایجاد شده و میزان سلول های زنده، با افزایش غلظت HD به شدت کاهش می یابد. غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار HD سبب کاهش سلول های زنده به میزان ۷۰ درصد پس از ۵ دقیقه و ۸۰ درصد کاهش پس از یک ساعت گردید (کنترل ۱۰۰ درصد). در حالی که غلظت ۳۰ میکرومولار HD حتی پس از یک ساعت در میزان سلول های زنده فقط ۱۸ درصد کاهش ایجاد نمود. با استفاده از منحنی دوز- جواب، غلظت مناسب HD در محیط کشت برای ایجاد ۵۰ درصد مرگ سلولی (LC₅₀) میزان ۱۸۰ میکرومولار طی ۱۵ دقیقه تعیین گردید. HMT با غلظت ۱۰ میکرومولار به تنهایی بر میزان سلول های زنده اثر معنی داری نداشت. پیش دریافت HMT قبل از HD در محیط کشت به طور معنی داری تا ۳۶ درصد مرگ سلولی ناشی از خردل را کاهش داد، لیکن با مصرف همزمان HMT و HD کاهش مرگ سلولی به ترتیب با متدهای GV و NR ۲۳ درصد و ۲۸/۵ درصد بوده است. مصرف HMT پس از آلودگی با HD اثر برجسته ای در پیش گیری از مرگ و میر سلولی نداشت.

۱ - استادیار - دانشگاه علوم پزشکی بقیه...^۱

۲ - کارشناس ارشد - دانشگاه علوم پزشکی بقیه...^۲

۳ - دانشجویار - دانشگاه علوم پزشکی بقیه...^۳

۴ - استادیار - دانشگاه علوم پزشکی بقیه...^۴

۵ - استادیار - دانشگاه علوم پزشکی بقیه...^۵

۶ - استادیار - دانشگاه علوم پزشکی بقیه...^۶

۷ - کارشناس ارشد - دانشگاه علوم پزشکی بقیه...^۷

۸ - استادیار - دانشگاه علوم پزشکی بقیه...^۸

۹ - استادیار - دانشگاه علوم پزشکی بقیه...^۹

۱۰ - استادیار - دانشگاه علوم پزشکی بقیه...^{۱۰}

بحث: نتایج فوق نشان می‌دهد که HMT می‌تواند سلول‌های فوق را در مقابل اثرات سمی HD محافظت نماید. هر چند HMT باید در زمان آلودگی با HD موجود باشد. مصرف HMT پس از تماس خردل با سلول‌ها تاثیری در پیشگیری از مرگ و میر سلولی نخواهد داشت. مطالعات درون تنی (In-vivo) برای تعیین اثربخشی و کارایی HMT در پیشگیری از سمیت ناشی از خردل پیشنهاد می‌گردد. مطالعه فوق نشان داد سلول‌های HF2FF مدل آزمایشگاهی ارزشمندی برای مطالعه سمیت HD و دیگر مواد آسیب رساننده به پوست و نیز بررسی سایر ترکیبات دارای کارایی بالقوه درمانی قبل از آزمایشات درون تنی می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: سولفور موستارد، سلول‌های HF2FF، هگزامتیلن تترامین (HMT)

مقدمه

سیستئین نیز برش‌های سلول‌های ریوی موش‌های صحرائی را در مقابل HD محافظت نموده است [۷].

به‌علاوه اثرات سمی HD بر لنفوسیت‌های خون محیطی انسان توسط گلوکاتایون اتیل استر کاهش یافته و N-استیل سیستئین (NAC) در In-vitro سلول‌های فوق را در مقابل اثرات سمی HD بر سلول محافظت نموده است [۷ و ۸]. ترکیبات فوق عمدتاً با تقویت و افزایش میزان گلوکاتایون داخل سلولی سبب افزایش توان مقابله سلول با HD شده و خود مستقیماً نوکلئوفیل نیستند. از طرفی هگزامتیلن تترامین ماده‌ای نوکلئوفیل با کارایی زیاد بوده که مصرف آن همزمان با HD در محیط کشت سلول‌های ریوی اثر محافظتی نشان داده است [۳]. اثر محافظتی این ماده در مقابل دوزهای کشنده فشن در انسان و حیوانات به اثبات رسیده است [۹]. با توجه به نقش پوست در محافظت از بدن و آلودگی سریع آن در مواجهه با مواد و سموم، آسیب‌پذیری آن به‌ویژه در تماس با HD بسیار شدید و وسیع می‌باشد. در این مطالعه اثر محافظتی HMT در محیط کشت سلول‌های فیبروبلاست پوست انسان و در مواجهه با HD بررسی گردید. با توجه به عدم امکان استفاده از مدل‌های زنده انسان و نیز مشکلات کشت بافت پوست و عدم دقت کافی در تهیه برش و نمونه‌های پوست به‌منظور تسهیل در ارزیابی HMT به‌عنوان یک نوکلئوفیل محافظ در مقابل HD یک مدل In-vitro از سلول‌های HF2FF نوع فیبروبلاست پوست انسان تهیه و مورد استفاده قرار گرفت.

بیس-(۲-کلرواتیل)-سولفید که عموماً سولفورموستارد و یا گاز موستارد نامیده می‌شود، در جنگ جهانی اول و نیز اخیراً بارها توسط عراق علیه ایران و نیز مواضع کردهای عراقی به کار رفت [۱ و ۲]. این ماده یک آلکیل‌کننده بسیار قوی بوده که در اثر تماس با پوست انسان ایجاد تاول‌های شدیدی می‌نماید [۱]. ایجاد تاول ممکن است بخشی به دلیل آزاد شدن پروتئازها باشد که سبب صدمه به گلیکوپروتئین‌هایی نظیر لامینین (واسطه اتصال درم و اپیدرم) می‌گردد [۲].

HD با گروه‌های نوکلئوفیل در سلول، به‌ویژه DNA به‌طور برگشت‌ناپذیر اتصال کوالان می‌یابد. این اتصال در بین رشته‌ها و نیز در سراسر یک رشته ممکن است ایجاد گردد که سبب مهار میتوز، تحلیل میزان NAD⁺، مهار گلیکولیز و نهایتاً مرگ سلولی می‌گردد. مرگ سلولی ممکن است مستقیماً از واکنش HD با آنزیم‌های مختلف از جمله سیستم پیرووات اکسیداز ایجاد گردد [۲].

پیش‌درمانی و محافظت بعضی از ارگان‌ها از جمله پوست و سیستم تنفسی با نوکلئوفیل‌ها ممکن است عوارض ناشی از تماس با خردل را تا حدودی مرتفع نماید. در این زمینه موفقیت‌هایی با استرهای سیستئین و گلوکاتایون اتیل استر حاصل شده است [۳، ۴]. ترکیبات دارای گروه‌های تیول مانند گلوکاتایون و مشتقات آن نظیر گاما-گلوکتامیل سیستئین سبب محافظت کراتینوسیت‌های پوست انسان در مقابل HD شده‌اند [۲، ۵ و ۶]. استرهای

مواد و روش کار

رده سلولی (HF2FF(NO.NCBI-C190) از انستیتو پاستور ایران، محیط کشت HBSS، M199 و RPMI از شرکت: Biochrom AM ;ICN , Biomedical Inc. از شرکت FBS از شرکت Sigma، HD از سازمان صنایع دفاع، آلمان، HMT از شرکت Sigma، HD از سازمان صنایع دفاع، تریپسین، لوله‌های فالكون و فیلتر سرسرنگی و سایر مواد مورد نیاز از کمپانی‌های مرک آلمان و بیورن تهیه گردیدند.

نحوه کشت سلولی: رده سلولی HF2FF در محیط کشت RPMI که شامل ۱۰ درصد FCS، پنی‌سیلین و استرپتومایسین هرکدام ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر و بیکرینات سدیم به میزان ۲ گرم بر لیتر است، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂، ۹۵ درصد هوای مرطوب، در فلاکس‌های ۵۰ml کشت داده شدند.

این سلول‌ها پس از رشد در فاز لگاریتمی با تریپسین جدا شده و در ۸۰- درجه سانتی‌گراد و DMSO ذخیره یا در آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. سلول‌های جدا شده از محیط کشت در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای با تراکم ۵×۱۰^۴ سلول در هر حفره با محیط M199 قرار گرفته و به مدت ۲۴ ساعت (قبل از آزمایش) برای چسبیدن سلول در همین حال باقی می‌ماند. HD در غلظت‌های مختلف ۳۰، ۱۰۰، ۱۸۰، ۳۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار در HBSS بلافاصله قبل از مصرف با استفاده از محلول استوک HD حاوی ۴۰ میلی‌مولار HD در پروپان دی‌اول تهیه گردید. محیط کشت بی‌رنگ M199 هنگام استفاده از رنگ NR برای پیش‌گیری از تداخل احتمالی ناشی از حضور فنل قرمز موجود در RPMI، مورد استفاده قرار گرفت. NR در لیزوزوم‌های سلول‌های زنده تجمع می‌یابد. متد سنجش فوق در این تحقیق به‌عنوان معیار اندازه‌گیری سلول‌های زنده مورد استفاده قرار گرفت [۱۰]. همچنین با استفاده از رنگ GV دانسیته سلول‌ها در محیط‌های حاوی سلول‌های تحت آزمایش اندازه‌گیری و نیز به‌عنوان معیاری اضافه بر NR برای تعیین میزان سلول‌های زنده به‌کار گرفته شد [۱۱].

اثر غلظت‌های مختلف HD بر سلول‌های HF2FF: محیط کشت RPMI موجود در مجاورت سلول‌ها در پلیت ۹۶ حفره‌ای خالی و با ۲۰۰ میکرولیتر از محلول HBSS حاوی رقت‌های مختلف خردل (۳۰، ۱۰۰، ۱۸۰، ۳۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار)

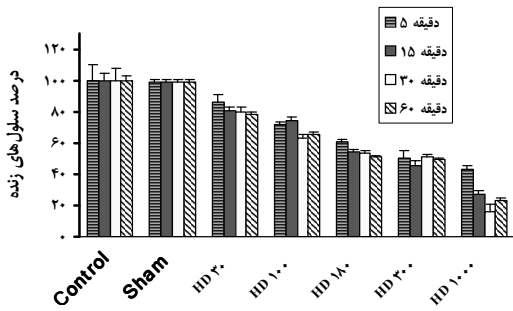
جایگزین گردید. سلول‌ها به مدت ۵ تا ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در معرض غلظت‌های مختلف خردل قرار گرفتند. سپس محیط حاوی HD تخلیه و ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت M199 به هر حفره اضافه گردید. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در شرایط گفته شده در بالا قرار گرفته، سپس متدهای GV و NR برای تعیین میزان سلول‌های زنده به‌کار گرفته شدند (n=۲۴). با استفاده از منحنی دوز-جواب، غلظت کشنده ۵۰ درصد (LC₅₀)، تعیین گردید.

بررسی اثر محافظتی HMT بر سلول‌های HF2FF در معرض خردل: توانایی HMT در مقابله با اثرات HD برای محافظت سلول‌ها در مقابل LC₅₀ از HD با افزودن محلول ۳۰ میلی‌مولار HMT + HBSS به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در پلیت‌های حاوی ۹۶ حفره (۲۶ حفره برای هر گروه) و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول HBSS + HD قبل، همزمان یا بعد از افزودن HMT انجام شد.

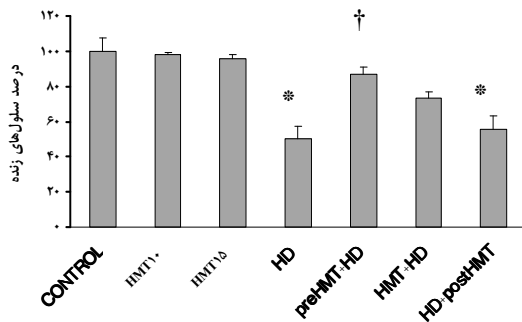
محیط‌های کشت به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد (۵ درصد از CO₂ و ۹۵ درصد هوا) انکوبه شده، سپس با ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت M199 جایگزین و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط فوق قرار گرفته، میزان سلول‌های زنده پس از زمان فوق با روش‌های GV و NR تعیین گردیدند. لذا سلول‌های HF2FF با HBSS به تنهایی، HBSS+HMT، HBSS+HD، HD+HBSS+HMT به‌صورت همزمان، قبل و بعد (۲۴ حفره برای هر گروه) مجاور گردیدند. غلظت نهایی HMT به تنهایی ۱۰ و یا ۱۵ میکرومولار و برای مجاورت با HD، غلظت نهایی ۱۵ میکرومولار تنظیم گردید. با توجه به گزارش‌های قبلی که نشان داده‌اند حتی غلظت‌های زیاد خردل (۱۰۰۰ میکرومولار) پس از ۲۰ ساعت اثر کاهنده بیشتری بر میزان سلول‌های زنده ندارد [۳]، حداکثر زمان در این آزمایش‌ها ۲۴ ساعت انتخاب گردید.

روش‌های آماری ANOVA، U-test و Mann-Whitney برای دوزهای مختلف HD و آزمون Students t-Test دوطرفه (unpaired) برای تعیین اثر محافظتی معنی‌دار HMT در کاربرد به‌صورت قبل، همزمان یا بعد از HD در مقایسه با HD به تنهایی به‌کار گرفته شد.

نتایج



شکل ۲: اثر غلظت‌های مختلف سولفور موستارد (HD) بر میزان سلول‌های زنده تعیین شده با استفاده از رنگ‌آمیزی قرمز خنثی (NR) در زمان‌های مختلف. داده‌ها برحسب درصد کنترل بیان شده‌اند. تعداد نمونه در هر گروه حداقل ۲۴ عدد می‌باشد. غلظت‌های مختلف HD در زمان‌های مختلف به‌طور بسیار معنی‌داری میزان سلول‌های زنده را کاهش داده است.



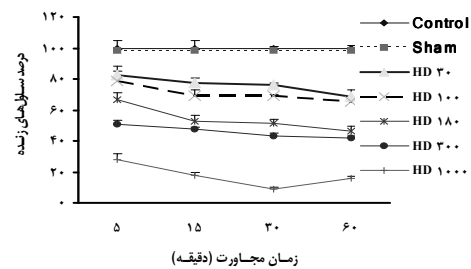
شکل ۳: اثر محافظتی هگزامتیلن‌ترامین (HMT) در پیشگیری از مرگ سلولی ناشی از سولفور موستارد (HD). میزان سلول‌های زنده با استفاده از رنگ آمیزی ویوله ژانسیان (GV) تعیین شده‌اند. HMT به تنهایی، قبل از (Pre-HMT+HD)، همزمان (HMT+HD) یا بعد از HD (HD+postHMT) به‌کار رفته است. * نسبت به گروه کنترل و † نسبت به HD معنی‌دار است. داده‌ها برحسب درصد کنترل بیان شده‌اند. تعداد نمونه در هر گروه حداقل ۲۴ عدد می‌باشد، $P < 0.001$.

اثر محافظتی HMT در مقابل اثرات HD بر سلول‌های

HF2FF: HMT به تنهایی در غلظت‌های ۱۰ و ۱۵ میلی مولار هیچ‌گونه اثر معنی‌داری بر میزان سلول‌های زنده نداشت. سلول‌های HF2FF ابتدا HMT را با غلظت نهایی ۱۵ میلی مولار دریافت نموده و سپس در معرض خردل قرار گرفتند. با استفاده از روش GV مشخص گردید میزان سلول‌های زنده از ۴۳/۲ درصد (در حضور HD) به ۷۸/۶ درصد (HMT+HD) افزایش می‌یابد

اثر دوزهای مختلف HD بر سلول‌های HF2FF: بیشترین

اثر مخرب خردل بر سلول‌های HF2FF در دوزهای بالاتر از ۳۰ میکرومولار مشاهده گردید. با افزایش غلظت HD اثر تخریبی به شدت افزایش یافت. HD با غلظت ۱۸۰ میکرومولار پس از ۱۵ دقیقه و با غلظت ۳۰۰ میکرومولار پس از ۵ دقیقه باعث مرگ تقریباً ۵۰ درصد از سلول‌ها شده است (LC_{50}). لذا غلظت ۱۸۰ میکرومولار HD به مدت ۱۵ دقیقه به‌عنوان دوز مناسب (LC_{50}) جهت آزمایش‌های بعدی در نظر گرفته شد (شکل ۱).



شکل ۱: اثر غلظت‌های مختلف سولفور موستارد (HD) بر میزان سلول‌های زنده تعیین شده با استفاده از رنگ‌آمیزی ویوله ژانسیان (GV) در زمان‌های مختلف. داده‌ها برحسب درصد کنترل بیان شده‌اند. تعداد نمونه در هر گروه حداقل ۲۴ عدد می‌باشد.

اثر غلظت‌های مختلف HD پس از ۱۵ دقیقه بر سلول‌ها نسبتاً

کامل شده و پس از آن تغییر معنی‌داری در سلول‌های زنده مشاهده نمی‌گردید. هرچند کاهش جزیی در سلول‌های زنده تا ۱ ساعت وجود داشته است (شکل ۲).

به‌عنوان مثال غلظت ۱۸۰ میکرومولار HD پس از ۵ دقیقه میزان سلول‌های زنده را به ۶۹/۹۴ درصد (سنجش با GV) و ۶۲/۳۶ درصد (NR) کاهش داده در حالی که با غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار به ۲۷/۸۲ درصد (GV) و ۴۲/۷۱ درصد (NR) کاهش یافته‌اند. لیکن با غلظت ۱۸۰ میکرومولار میزان سلول‌های زنده پس از ۱۵ دقیقه به ۵۵ درصد (GV) و با غلظت ۱۰۰۰ به ۱۷/۸۵ درصد (GV) کاهش یافته‌اند. روش‌های GV و NR با تعیین تعداد سلول‌های زنده بروز اثر سریع HD را در غلظت‌های زیاد اثبات نمودند و پس از ۵ دقیقه با دوز بالا (۱۰۰۰ میکرومولار) بیش از ۷۰-۶۰ درصد سلول‌ها از بین رفتند.

بحث

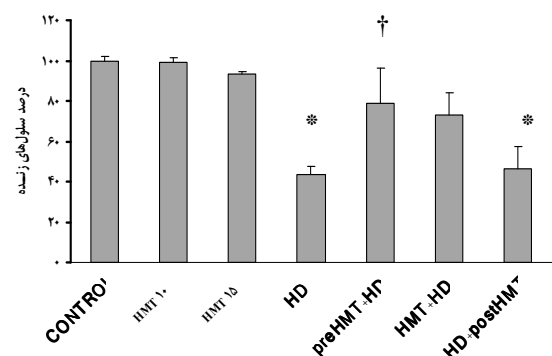
مطالعه با سلول‌های HF2FF نشان داد این سلول‌ها به‌عنوان مدلی از سلول‌های پوستی انسانی برای ارزیابی اثرات HD و نیز بررسی کارایی داروهای مختلف و اثرات درمانی احتمالی آن‌ها بر عوارض HD مدلی بسیار مناسب می‌باشند. از سلول‌های فوق می‌توان قبل از مطالعات درون تنی جهت ارزیابی اثرات مفید و نیز اثرات احتمالی مضر و سمی داروها بر سلول‌های فیبروبلاست پوست 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.

در ابتدا غلظت‌های مختلف HD برای تعیین غلظت مناسب و LC₅₀ به منظور ارزیابی اثر محافظتی ترکیبات از جمله HMT مورد استفاده قرار گرفت. بروز سریع اثرات HD نشان داد که این ماده یکی از سموم بسیار سریع‌الاثربوده و بویژه در دوزهای بالاتر از ۳۰ میکرومولار ظرف کمتر از ۵ دقیقه اثرات مخرب و کشنده بر سلول‌ها ایجاد می‌نماید. این اثر کاملاً وابسته به غلظت بوده و با آن نسبت مستقیم دارد. لیکن بیشترین اثر را در حداقل زمان (۵ دقیقه) ایجاد نموده و پس از آن میزان تغییرات سلول‌های زنده کمتر می‌باشد. به‌عنوان مثال با دوز ۱۰۰۰ میکرومولار در زمان صفر تا ۵ دقیقه میزان کاهش حدود ۷۵ درصد ولی از زمان ۵ تا ۱۵ دقیقه این کاهش حدود ۵ درصد می‌باشد. لذا اثر مرگبار سلولی HD در حداقل زمان ممکن ایجاد می‌گردد. در زمان‌های طولانی‌تر از ۱۵ دقیقه تغییر میزان سلول‌های زنده بسیار کمتر از زمان اولیه است. با توجه به ثابت شدن نسبی اثر HD در زمان‌های ۶۰-۱۵ دقیقه و گزارش‌های قبلی در این خصوص [۳]، میزان سلول‌های زنده تا ۱ ساعت پس از آلودگی تعیین گردید. زیرا پس از ۳۰ دقیقه اثر معنی‌داری در کاهش تعداد سلول‌های زنده مشاهده نشده است. آثار فوق شاید دال بر چندین محل اثر در سلول باشد. زیرا با افزایش غلظت HD فقط زمان بروز اثرات سمی به‌سرعت کاهش یافته است.

نتایج نشان داد که غلظت ۱۸۰ میکرومولار HD برای ارزیابی کارایی و اثرات محافظتی داروها و مواد ضداکسیدان مناسب

(شکل ۳). با روش اندازه‌گیری NR میزان سلول‌های زنده از ۵۰/۳ (در حضور HD به تنهایی) تا ۸۶/۶ (HMT+HD) افزایش نشان داده که از نظر آماری معنی‌دار ($p < 0.001$) می‌باشد.

مصرف همزمان HD و HMT در محیط کشت سلول‌های HF2FF نشان داد HMT می‌تواند در مقایسه با HD به تنهایی میزان سلول‌های زنده را ۲۳ درصد و ۲۹ درصد به‌ترتیب با روش سنجش NR و GV افزایش دهد ($p < 0.001$) (شکل‌های ۳ و ۴). مصرف HMT پس از افزودن HD هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری در افزایش میزان سلول‌های زنده ایجاد نمود و تنها حدود ۵ درصد افزایش در میزان سلول‌های زنده مشاهده گردید. مطالعات میکروسکوپی نشان داد، سلول‌ها پس از آلودگی با HD کاملاً از یکدیگر جدا، چروکیده و نکروز شده‌اند.



شکل ۴: اثر محافظتی هگزامتیلن تترامین (HMT) در پیش‌گیری از مرگ سلولی ناشی از سولفور موستارد (HD). میزان سلول‌های زنده با استفاده از رنگ‌آمیزی فرمز خنثی (NR) تعیین شده‌اند. HMT به تنهایی، قبل از (PreHMT+HD)، همزمان (HMT+HD) یا بعد از (HD+postHMT) HD به کار رفته است. داده‌ها برحسب درصد کنترل بیان شده‌اند. * نسبت به گروه کنترل و † نسبت به HD معنی‌دار است. تعداد نمونه در هر گروه حداقل ۲۴ عدد می‌باشد ($P < 0.001$).

لذا نتایج فوق نشان می‌دهد هرچند هر دو روش مصرف HMT قبل و یا همزمان با HD اثر محافظتی برجسته‌ای بر سلول‌های HF2FF دارد، لیکن مصرف HMT قبل از HD اثر محافظتی بیشتری (۳۵ درصد در مقابل ۲۳-۲۹ درصد) بر سلول‌های فوق ایجاد می‌نماید.

نتایج، احتمالاً کاربرد HMT قبل از آلودگی با HD اثرات محافظتی بیشتری نسبت به مصرف همزمان آن خواهد داشت. بنابراین بهتر است این ماده قبل از آلودگی با HD در محیط موجود باشد.

افزایش غلظت HMT به بیش از ۲۵ میلی‌مولار اثرات محافظتی بیشتری از خود نشان نداده است که دال بر اثر محدود HMT می‌باشد. همچنین خارج نمودن HMT از محیط کشت قبل از آلودگی با HD، اثر محافظتی ایجاد نموده است [۳]. در این خصوص دو احتمال وجود دارد. ۱- شاید HMT توانایی ورود به سلول را نداشته باشد. ۲- احتمالاً HMT موجود در هنگام آلودگی با HD، به‌عنوان یک نوکلئوفیل قوی عمل نموده و با یون سولفونیوم ایجاد شده توسط HD سریعاً و قبل از واکنش با عناصر سلولی، واکنش داده و آن را بی‌اثر می‌نماید. به‌عنوان یک نتیجه کلی، برای اثربخشی وجود HMT قبل از HD ضروری است.

مقایسه نتایج این مطالعه با مطالعات قبلی با HD و HMT بر روی رده سلول‌های عمقی ریه (A549) اثرات تقریباً مشابهی را نشان داده است. هرچند حساسیت سلول‌های فیبروبلاست به کار گرفته شده در این مطالعه (HF2FF) نسبت به HD تقریباً مشابه سلول‌های (A549) بوده، لیکن اثرات محافظتی HMT بر سلول‌های ریوی [۳] و افزایش تعداد سلول‌های زنده تا حدودی بیشتر بوده است (در سلول‌های HF2FF ۱/۸ برابر در مقابل ۲ برابر افزایش سلول‌های زنده در سلول‌های A549 با حضور HMT). همچنین با توجه به دوز بکار رفته HD و LC50 (در این مطالعه) سلول‌های فیبروبلاست نسبت به سلول‌های کراتینوسیت رده SVK14 [۵] در مقابل اثرات مخرب HD مقاوم‌تر می‌باشند.

اثر محافظتی HMT نشان می‌دهد که نوکلئوفیل‌هایی غیر از سیستئین یا سایر ترکیبات دارای گروه‌های تیول نیز به‌طور قابل ملاحظه‌ای اثر حفاظتی در مقابل HD ایجاد می‌نمایند. مقایسه اثر این ماده با ترکیباتی نظیر N-استیل سیستئین [۱۳] نشان می‌دهد HMT در مقابله با HD کارایی بیشتری داشته است. مقاومت بیشتر سلول‌های ریوی ممکن است به ساخت گاماگلوتامیل ترانسفراز (GGT) در سلول‌های اپی‌تلیال آلوئولار تیپ II ارتباط داشته باشد [۱۴، ۱۵]. با توجه به مکانیسم‌های عمل HD و

می‌باشد. تغییرات مرفولوژیک سریع سلول‌های HF2FF در برابر دوزهای زیاد HD (۱۰۰۰ میکرومولار) شامل چروکیده شدن و جدایی از یکدیگر به‌علاوه توانایی احتباس رنگ NR احتمال به‌وجود آمدن آپوپتوزیس را که متعاقب شکسته شدن غشاء سلول رخ خواهد داد به ذهن متبادر می‌کند. لیکن مرگ سلولی ناگهانی و سریع تعداد زیادی از سلول‌ها پس از ۵ دقیقه و متناسب باغلظت می‌تواند بیشتر دال بر نکرکز سلولی باشد. هر چند اتصال HD به DNA و شکسته شدن DNA سبب فعال شدن آنزیم پلی-ADP-ریبو پلی‌مراز و لذا کاهش NAD^+ ، ATP و شکسته شدن آن‌ها و سرانجام افزایش رادیکال آزاد اکسیژن و مرگ سلول می‌گردد، لیکن مکانیسم سریع‌تر مرگ سلولی شاید بیشتر به کاهش GSH و الکیلاسیون تیول پروتئین‌ها ارتباط داشته باشد. متعاقب این عمل، HD با غیرفعال نمودن آنزیم‌ها و نیز پمپ Ca^{2+} -ATPase باعث افزایش سریع کلسیم داخل سلولی شده که متعاقب آن با فعال شدن اندونوکلازها و پروتئازها مرگ سلولی ایجاد می‌گردد [۱۲].

مطالعات متعددی اثرات محافظتی HMT را در مدل‌های سلولی مختلف نشان داده‌اند. HMT به همراه گلوکاتیون احیاء سبب محافظت سلول‌های SCK14 (رده سلولی کراتینوسیت انسانی) تا ۷۲ ساعت در مقابل غلظت ۱۰ میکرومولار HD شده است. همچنین سلول‌های عمقی ریه شامل رده سلولی A549 تحت اثرات محافظتی HMT، در مقابل اثرات مخرب HD مقاومت نشان داده و تعداد سلول‌های زنده پس از ۴۸ ساعت بیش از ۹۰ درصد افزایش نشان داده‌اند [۳]. مطالعه با سلول‌های لنفوسیت خون انسانی نشان داده که سیستئین اثر محافظتی کمتری در برابر HD ایجاد می‌نماید [۸]. لیکن استرهای سیستئین سبب افزایش این ماده در داخل سلول و کاهش میزان HD موجود در سلول شده و اثرات مخرب و صدمات سلولی را در برش‌های سلول‌های ریه موش صحرایی کاهش داده‌اند. ولی در مواجهه بعدی سلول‌های ریه با HD استرهای سیستئین توانایی محافظت سلول‌ها را نداشته‌اند [۶]. در این مطالعه کاربرد HMT قبل از HD و همزمان با HD میزان سلول‌های زنده را به ترتیب ۱/۸۱ و ۱/۶۸ برابر افزایش داده و پس از آلودگی بی‌تاثیر بوده است. با توجه به

با توجه به بروز بسیار سریع واکنش HD با عناصر سلولی، بهترین روش برای مقابله با آن به کارگیری مواد محافظ در برابر HD از جمله فرمولاسیون‌های رفع آلودگی نظیر کلرامید ۳۳۰-S بوده که در محیط‌های قطبی و یا غیرقطبی (روغنی) نیز بلافاصله آن را خنثی می‌نماید [۱۶]. شاید به کارگیری همزمان چندماده محافظ از جمله HMT و NAC اثرات به مراتب قوی‌تری ایجاد نمایند که در مراحل بعدی کار مورد ارزیابی قرار خواهند گرفت.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهش دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) و پژوهشکده طب‌رزمی- مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی انجام گرفته است که بدین وسیله از زحمات همکاران گرامی در آن معاونت و مرکز تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

بیشترین اتصال آن به ملکول گوانین در ساختمان DNA، احتمالاً HMT که خود نیز ۴ اتم N در هر مولکول داشته حداقل اثر نوکلئوفیل برابری با اتم N شماره ۷ حلقه گوانین دارد. HMT احتمالاً می‌تواند با اتصال HD به گوانین در ساختمان‌های ملکولی سلول مقابله نموده و اثر محافظتی ایجاد نماید. لذا کارآیی بیشتر HMT در مقایسه با NAC که گروه‌های تیول بیشتری را در سلول احیاء نموده و سطح گلوپروتئین را افزایش می‌دهد شاید به دلیل اثر مستقیم HMT در مواجهه با سولفونیوم بوده در حالی که NAC و ملکول‌های مشابه با افزایش و بالا نگه‌داشتن سطح گلوپروتئین سلول قبل از مواجهه با HD عمل می‌نمایند و مقدار گلوپروتئین ممکن است برای مقابله با HD و اثرات سریع و مستقیم آن کافی نبوده HD بلافاصله از طریق پراکسیداسیون چربی‌ها قبل از واکنش با سایر عناصر سلولی عمل نماید.

منابع

- 1- Vijayarahavan R, Kumar P, Joshi U, Raza SK, Rao PVL, Malhotra RC, Jaiswal DK. Prophylactic efficacy of amifostine and its analogues against sulphur mustard toxicity. *Toxicol* 2001;163:83-91.
- 2- Lindsay CD, Hambrook JL. Disopropyl glutathione ester protects A549 cells from the cytotoxic effects of sulphur mustard. *Human & Exp Toxicol* 1998;17:606-12.
- 3- Lindsay CD, Hambrook JL. Protection of A549 cells against the toxic effects of sulphur mustard by hexamethylene tetramine. *Human & Exp Toxicol* 1997;16:106-14.
- 4- Cross CL, Innace JK, Krebs Rc, Smith WJ, Meier hl. Sulfur mustard (HD) cytotoxicity in lymphocytes can be affected by intracellular glutathione level. *Proceedings of the Medical defense Biosci Rev* 1989;p.415-8.reviwee.
- 5- Smith CN, Lindsay CD. Protection of SVK-14cells by sulphydryl compounds in vivo against sulphur mustard cytotoxicity. *Human & Exp Toxicol* 1996;15:75-6.
- 6- Smith CN, Lindsay CD, Rice P. The use of full thickness explanted human skin to model sulfur mustard induced skin injury. *Human and Exp Toxicol* 1996;15:164.
- 7- Wilde PE, upshall DC. Cysteine esters protect cultured rodent lung slices from sulphur mustard. *Human & Exp Toxicol* 1994;13:743-8.
- 8- Gross CL, Innace JK, Hovatter RC, Meier HL, Smith WJ. Biochemical manipulation of intracellular glutathione levels influences cytotoxicity to isolated human lymphocytes by sulfur mustard. *cell Biol & Toxicol* 1993;9:259-67.
- 9- Diller WF. Medical phosgene problems and their possible solution. *J Occupational Medicine* 1978;20:189-93.
- 10- Arnold R, Humbert B, Werchau H, Gallafi H, Konig W. Interleukin-8, interleukin-6, and soluble tumour necrosis factor receptor type I released from a human pulmonary epithelial virus. *Immunol* 1994;82:126-33.
- 11- Griffiths GD, Liudsay CD, Upshall DG. Examination of the toxicity of several protein toxins of plant origin using bovine pulmonary endothelial cells. *Toxicol* 1994;90:11-27.
- 12- Papirmeister B, Feister AJ, Robinson SI, Ford RD. Medical defence aginist mustard gas: Toxic mechanisms and pharmacological implications. *CRC Press* 2000;p.185-90.
- 13- Black RM, upshall DG. Assessing the danger. *Chem in Britain* 1988;July,654-664.
- 14- Juyce M, Steitz TA, Zigmund SH, Borleis J. Synthesis and release of amphipathic gamma-glutamyl transferase by the pulmonary alveolar type 2 cell. *The J Biol Chem* 1994;142:19-26.
- 15- Dale AD, Hunry JF. Glutathione in defense and signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002;973:488-504.
- 16- Shih ML, Korte WD, Smith GR, Szafranec LL. Reactions of sulfides with S-330, a potential decontaminant of sulfur mustard in formulations. *J Appl Toxicol* 1999;1:S83-8.