

تأثیر سولفورموستارد بر نکروز سلول‌های اپی‌تلیال مجرای ادراری کلیه در موش صحرایی

غلامعلی میرشفیعی* MSc، سیدهمایون صدرائی^۱ PhD، حسین بهادران^۱ PhD، غلامرضا کاکا^۲ PhD، حسین دشتنورد^۱ PhD،محمد رضا نورانی^۳ PhD، محمود مفید^۱ MSc، حسین مهدوی نسب^۱ MSc، عباسعلی ایمانی فولادی^۴ PhD^{*} گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (ت)، تهران، ایران^۱ گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (ت)، تهران، ایران^۲ مرکز تحقیقات علوم اعصاب، پژوهشگاه علوم پزشکی بقیه... (ت)، تهران، ایران^۳ مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، پژوهشگاه علوم پزشکی بقیه... (ت)، تهران، ایران^۴ مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی مولکولی، پژوهشگاه علوم پزشکی بقیه... (ت)، تهران، ایران

چکیده

اهداف: کلیه، اندامی پرخون است و در معرض تاثیرات گاز خردل قرار می‌گیرد. سولفورموستارد باعث مرگ سلولی و ریزش سلول‌های اپی‌تلیال در لوله‌های ادراری می‌شود. این مطالعه با هدف بررسی آثار و عوارض تخریب بافتی و سلولی ناشی از سولفورموستارد در موش‌های صحرایی انجام شد.

روش‌ها: این مطالعه تجربی روی ۱۰۰ سر موش صحرایی انجام شد. دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌عنوان دوز مطلوب که در آن حیوان برای مدت بیش از ۱۰ هفته به زندگی ادامه می‌داد و دوزهای ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم برای بررسی تغییرات بافتی تعیین شد. تغییرات بافتی پس از ۲، ۱۴، ۲۸ و ۵۶ روز در ۱۲ گروه تجربی (۳ گروه برای بررسی اثر دوزهای یادشده در هر مقطع زمانی) بررسی شد. ۴ گروه کنترل (یک گروه برای هر مقطع زمانی) فقط محلول تیروز در یافت نمودند و ۴ گروه طبیعی هیچ ماده‌ای دریافت نکردند. اسلایدهای تمام گروه‌ها مقایسه و نوع و میزان تغییرات بافتی گروه‌ها ارزیابی شد. داده‌ها با آزمون آنوای یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی با نرم‌افزار SPSS 13 تحلیل شد.

یافته‌ها: بین گروه‌های کنترل و طبیعی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در تمام گروه‌های تجربی نکروز و ریزش سلول‌های اپی‌تلیالی در مجرای لوله ادراری مشاهده شد. این میزان فقط در گروه ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خردل به‌مدت ۵۶ روز، نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌دار داشت.

نتیجه‌گیری: مواجهه با سولفورموستارد سبب نکروز و ریزش سلول‌های اپی‌تلیالی کلیه در موش‌های صحرایی می‌شود که افزایش میزان آن تنها در دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و مدت ۸ هفته معنی‌دار است.

کلیدواژه‌ها: سولفورموستارد، نکروز لوله ادراری، ریزش سلول اپی‌تلیال

Effect of sulfur mustard on the epithelial cell necrosis of urinary duct of kidney in rat

Mirshafiee Gh. A.* MSc, Sadraei S. H.¹ PhD, Bahadoran H.¹ PhD, Kaka Gh. R.² PhD, Dashtnavard H.¹ PhD, Nourani M. R.³ PhD, Mofid M.¹ MSc, Mahdavinassab H.¹ MSc, Imani Fouladi A. A.⁴ PhD

*Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

¹Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

²Neuroscience Research Center, Baqiyatallah Institute of Medical Sciences, Tehran, Iran

³Chemical Injuries Research Center, Baqiyatallah Institute of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴Molecular Cell Biology Research Center, Baqiyatallah Institute of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Aim: Kidney is a high vascularized organ which can be affected by sulfur mustard. Sulfur mustard causes tubular necrosis and urinary epithelial cell sloughing. The aim of this study was to evaluate the cellular and tissue damages in rats exposed to sulfur mustard.

Methods: This experimental study was performed on 100 rats. 10 mg/kg was assigned as the desirable dose which rats could live at least 10 weeks while receiving it. 2.5 and 5 mg/kg were also assigned as doses in which tissue changes were studied. Tissue changes were evaluated after 2, 14, 28 and 56 days in 12 experimental groups (3 groups for each time period each one receiving one of the 3 mentioned doses). 4 natural groups (one for each time period) received no injection and 4 control groups only received Tyrode's solution. Prepared slides of all groups were compared and histological changes were evaluated. Data was analyzed using one-way ANOVA and Tukey's Post-hoc test by SPSS 13 software.

Results: Data of this study revealed no remarkable difference between natural and control groups. Tubular necrosis and urinary epithelial cell sloughing were observed in all experimental groups. The rate was statistically significant only in group which received 10 mg/kg sulfur mustard for 56 days compared to the control group.

Conclusion: Exposure to sulfur mustard cause tubular necrosis and urinary epithelial cell sloughing in rats and its increase in statistically significant in rats receiving 10 mg/kg for 8 weeks.

Keywords: Sulfur Mustard, Tubular Necrosis, Epithelial Cell Sloughing

مقدمه

شیمیایی، موارد ایمنی و حفاظت شخصی شدیداً رعایت شد. بنابراین در تمام مراحل عملیاتی، استفاده از دستکش محافظ، لباس روپوش (گان)، ماسک، روکش برای کفش و کاربرد مواد خنثی کننده عامل شیمیایی ضرورت داشت.

برای تعیین دوزهای مورد نظر عامل خردل که در آن دوز، حیوان بتواند به زندگی خود ادامه دهد و بر اثر عوارض کشندگی عامل تلف نشود، دوز پایه تعیین شد. برای این کار از ۱۲۵ سر موش صحرایی استفاده شد. در دوزهای ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم، موش‌ها مدت زمان مورد نظر را تحمل نکرده و تلف شدند. بنابراین، دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم به عنوان دوز مطلوب که در آن، حیوان برای مدت بیش از ۱۰ هفته به زندگی ادامه می‌داد، انتخاب شد. دو دوز پایین تر ۲/۵ و ۵ میلی گرم بر کیلوگرم نیز برای بررسی تغییرات بافتی و مقایسه شدت عامل تعیین شدند.

تغییرات بافتی در رابطه با هر ۳ دوز مورد آزمایش در زمان‌های ۲ روز به صورت حاد و ۲ هفته (۱۴ روز)، ۴ هفته (۲۸ روز) و نیز ۸ هفته (۵۶ روز) به صورت مزمن مورد بررسی قرار گرفت. برای هر گروه زمانی با دوز معین، تعداد ۵ سر موش صحرایی در نظر گرفته شد. در کنار هر کدام از این گروه‌ها، تعداد ۵ سر حیوان به عنوان کنترل (که محلول تیروزد به آنان تزریق می‌شد) و ۵ سر حیوان دیگر با عنوان طبیعی (که هیچ نوع ماده‌ای به آن تزریق نمی‌شد) قرار گرفت. هر گروه حیوان در قفسه‌های ۵ تایی جای داده شدند. شرایط آب و هوا، دمای محیط، نوع روشنایی و تغذیه تمام حیوانات و تمام گروه‌ها یکسان بود. مشخصات هر گروه که نشانگر ویژگی میزان دوز عامل و مدت زمان نگهداری پس از تزریق بود، روی دیوار هر قفس نوشته شد. علاوه بر نشانه فوق، هر حیوان علامت‌گذاری شد تا در هنگام اندازه‌گیری در موقعیت‌های مختلف، مشخص باشد. تاریخ تزریق و تاریخ خروج حیوان از برنامه به عنوان شاخصه دیگر در نظر گرفته شد. برای آن که حیوان به شرایط محیط آزمایشگاه عادت کند، به مدت یک هفته از زمان تحویل از حیوان‌خانه دانشگاه واقع در مجتمع، در آزمایشگاه نگهداری می‌شد و بعد از آن مورد بررسی و تزریق ماده مورد نظر قرار می‌گرفت.

سولفورموستارد مورد استفاده، به صورت مایع روغنی با درصد خلوص ۹۹٪ و وزن مخصوص ۱/۲۷۰ گرم بر میلی لیتر بود. بنابراین به منظور تهیه دوزهای ۲/۵، ۵ و ۱۰ میکرولیتر بر کیلوگرم به این صورت عمل شد:

بر اساس وزن مخصوص سولفورموستارد مایع، حجم مورد نیاز برای دوز ۲/۵ میکرولیتر بر کیلوگرم حجمی برابر با ۱/۹۶ میکرولیتر (۰/۰۰۱۹۶ میلی لیتر)، برای دوز ۵ میکرولیتر بر کیلوگرم حجمی برابر ۳/۹ میکرولیتر (۰/۰۰۳۹ میلی لیتر) و برای دوز ۱۰ میکرولیتر بر کیلوگرم، حجم ۷/۸ میکرولیتر (۰/۰۰۷۸ میلی لیتر) تعیین شد. عامل شیمیایی خردل تهیه شده، ابتدا توسط حلالی حل شد تا از آن طریق بتواند به بدن منتقل شود. از حلال‌های مختلفی که برای عامل وجود دارد، نوع

سولفورموستارد، عامل آلیکله‌کننده‌ای است که طیفی از پاسخ‌های سمی را در افرادی که در معرض این ماده قرار می‌گیرند، ایجاد می‌کند. همچنین این ماده باعث سائتو-توکسیتی می‌شود [۱]. سولفورموستارد به دلیل آلیکلاسیون DNA، با ایجاد یک سری از واکنش‌ها موجب از بین رفتن روند کنترلی فرآیندهای نرمال سلول می‌شود [۲]. این ماده در بدن تولید یون سولفونیوم می‌کند که این یون باعث آلیکله شدن DNA و در نتیجه شکسته شدن رشته‌های DNA و ایجاد اتصالات عرضی در دو رشته DNA و نیز باعث اختلال در سنتز DNA و تقسیم سلولی یا مرگ سلولی می‌شود [۳، ۴].

کلیه، از جمله ارگان‌هایی است که جریان خون به مقدار فراوان در آن جریان دارد. با توجه به وجود عنصر سمی موستارد در جریان خون و گذر جریان بافت خونی برای تصفیه در مراحل مختلف ترشح، باز جذب و دفع، این ماده می‌تواند بر سلول‌های اپی تلیال لوله‌های ادراری نفرون، اثر تخریبی داشته باشد. بنابر تحقیقات و شواهد موجود در مورد اثرات گاز خردل بر انسان و حیوانات، کلیه و کبد جزء احشایی هستند که تحت تاثیر تخریب گاز خردل قرار می‌گیرند [۴، ۵].

مشاهده شده است که سولفورموستارد باعث ایجاد آپوپتوزیس و نکروزیس می‌شود [۶] که میزان آپوپتوز، بستگی به زمان دارد و هنگامی که سلول‌ها در مدت زمان کوتاه در تماس با دوز بالایی از سولفورموستارد قرار بگیرند، میزان آپوپتوز بالا است. تماس با سولفورموستارد در زمان‌های طولانی باعث نکروزیس می‌شود. این ماده در میزان متوسط باعث القای آپوپتوزیس و در حالت شدید باعث نکروزیس می‌شود [۷].

در مسمومیت‌های دارویی، درجات مختلف دژنراسیون سلولی در لوله‌های ادراری وجود دارد. ریزش سلول‌های اپی تلیال و گشاد شدن قطر لوله‌های ادراری و پارگی دیواره مجرا در بیشتر موارد دیده شده است. تغییرات دژنراسیون سلول اپی تلیال در مجرای ادراری و پرخونی عروق در قسمت‌های مختلف فضای بینابینی در قشر و ناحیه مرکزی، از عوارض مصرف داروی دیکلوفناک گزارش شده است [۸].

هدف از این مطالعه، بررسی آثار و عوارض تخریب بافتی و سلولی شامل مرگ سلول و ریزش سلول‌های اپی تلیال در مجرای لوله ادراری بود تا با شناخت میزان و نوع تخریب بافتی، در مورد نقش مواد محافظتی و پیش‌درمانی روی اثرات گاز خردل تمهیداتی اندیشیده شود.

روش‌ها

این مطالعه روی ۲۲۵ سر موش صحرایی نر نژاد آلبینو-ویستار با میانگین وزن 40 ± 20 گرم انجام شد. انتخاب آنها به‌طور تصادفی بود و آب و غذا به‌طور مرتب کنترل شد. در تمام مراحل کار کردن با عامل

قالب‌ها در دمای اطاق و انجماد پارافین مذاب، بلوک‌ها از قالب جدا و در سردخانه یخچال نگهداری شدند. با استفاده از میکروتوم، برش‌های ۵ میکرونی از بافت قالب‌گیری شده، تهیه شد. سپس این برش‌ها توسط حمام آب گرم روی لام‌های آماده شده پهن شدند. در این حالت لام‌ها پس از خشک شدن، آماده رنگ‌آمیزی شدند. از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- اتوزین برای مطالعات بافت‌شناسی استفاده شد. بدین‌منظور هماتوکسیلین آوم‌هاریس و محلول ۱٪ اتوزین ذخیره مورد استفاده قرار گرفت. سپس لام‌های تهیه شده از بافت کلیه، مورد بررسی‌های بافت‌شناسی قرار گرفتند. نمونه اسلایدهای بافتی گروه‌های تجربی و تغییرات مورفولوژیکی و هیستولوژی موجود در این لام‌ها با لام‌های گروه شاهد و گروه کنترل مقایسه شدند و نوع و میزان این تغییرات بافتی در گروه تجربی در دوزهای مختلف و همچنین روزهای مورد نظر که بافت در معرض تاثیرگذاری عامل شیمیایی بوده است، ارزیابی شد.

مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که عوارض بافتی در توکسین‌های کلیوی شامل مرگ سلولی، ریزش سلولی در دیواره لوله‌های ادراری، خونریزی عروقی، ارتشاح سلولی در فضای بینابینی، ازهم‌پاشیدگی (به هم پیوستگی) دیواره لوله‌های ادراری و نیز از بین رفتن نظم سلول اپی‌تلیالی در چینش دیواره مجاری ادرار، حفظ اسکلت جسم کلیوی و به هم ریختگی کلاف گلمرولی و وجود سلول‌های چند هسته‌ای و تک‌هسته‌ای در فضای بینابینی است [۸]. برای بررسی و مقایسه هر کدام از مشخصه‌هایی که ذکر شد، ارزیابی تغییرات پاتولوژیک، به تفکیک درجه‌بندی انجام شد. برای ارزیابی میزان تغییرات تخریبی از علامت‌های ++++ به معنای شدید، +++ به معنای زیاد، ++ به معنای متوسط، + به معنای خفیف و صفر به معنای طبیعی استفاده شد. برای درجه‌بندی نظم سلولی از میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی $400\times$ استفاده شد. سطح مورد نظر برای مطالعه برابر با 141000 میکرومتر مربع بود. ناحیه قشر و مدولا کلیه در هر نمونه بافتی در ۳ نقطه (بالا، وسط و پایین) مشاهده و تغییرات آنها ثبت شد. وسعت دید، فضای عدسی بود. در هر وسعت دید، عنصر مورد نظر که شامل کپسول بومن، لوله پیچ‌دار اولیه، لوله پیچ‌دار ثانویه، قوس هنله، مجاری جمع‌کننده ادرار و بالاخره فضای بینابینی بود، مشاهده می‌شد. در تجزیه و تحلیل اطلاعات از آزمون آماری آنوای یک‌طرفه توسط روش پست‌هوک توکی با استفاده از نرم‌افزار SPSS 13 استفاده شد. مقادیر در نمودارها برحسب میانگین \pm انحراف معیار ارایه شده است.

نتایج

مرگ سلولی در نمونه‌های تجربی قابل مشاهده بود. میزان نکروز سلولی نسبت به نمونه‌های شاهد و طبیعی در نمونه‌های تجربی بیشتر بود (شکل ۱). در نمونه‌های تجربی، به موازات افزایش شدت غلظت عامل خردل، میزان مرگ سلولی نیز افزایش می‌یافت. در نمونه‌هایی که با دوز $2/5$ میلی‌گرم بر کیلوگرم آلوده شدند، نکروز سلولی در دوره‌های

بافر تیروزد انتخاب شد. دلیل انتخاب این بافر، غیرسمی بودن و عدم تحریک ایمنولوژیکی آن و همچنین کاربری بیشتر این حلال در تحقیقات انجام شده قبلی بود. میزان $2/5$ میکرولیتر بر کیلوگرم سولفورمستارد برابر با $0/4$ میکرولیتر برای یک حیوان 200 گرمی، میزان 5 میکرولیتر بر کیلوگرم برابر با $0/8$ میکرولیتر و میزان 10 میکرولیتر بر کیلوگرم برابر با $1/6$ میکرولیتر استفاده شد. میزان $0/4$ میکرولیتر سولفورمستارد در $99/6$ میکرولیتر و میزان $0/8$ میکرولیتر سولفورمستارد در $99/2$ میکرولیتر و میزان $1/6$ میکرولیتر سولفورمستارد در $98/4$ میکرولیتر محلول تیروزد حل شد.

گروه‌های هر دوره زمانی شامل موارد زیر بودند:

۱- گروه کنترل: در این گروه برحسب وزن حیوان به میزان تعیین شده طبق فرمول، محلول تیروزد توسط سرنگ انسولین در ناحیه ایلیاک چپ به صورت زیرصفاقی تزریق شد.

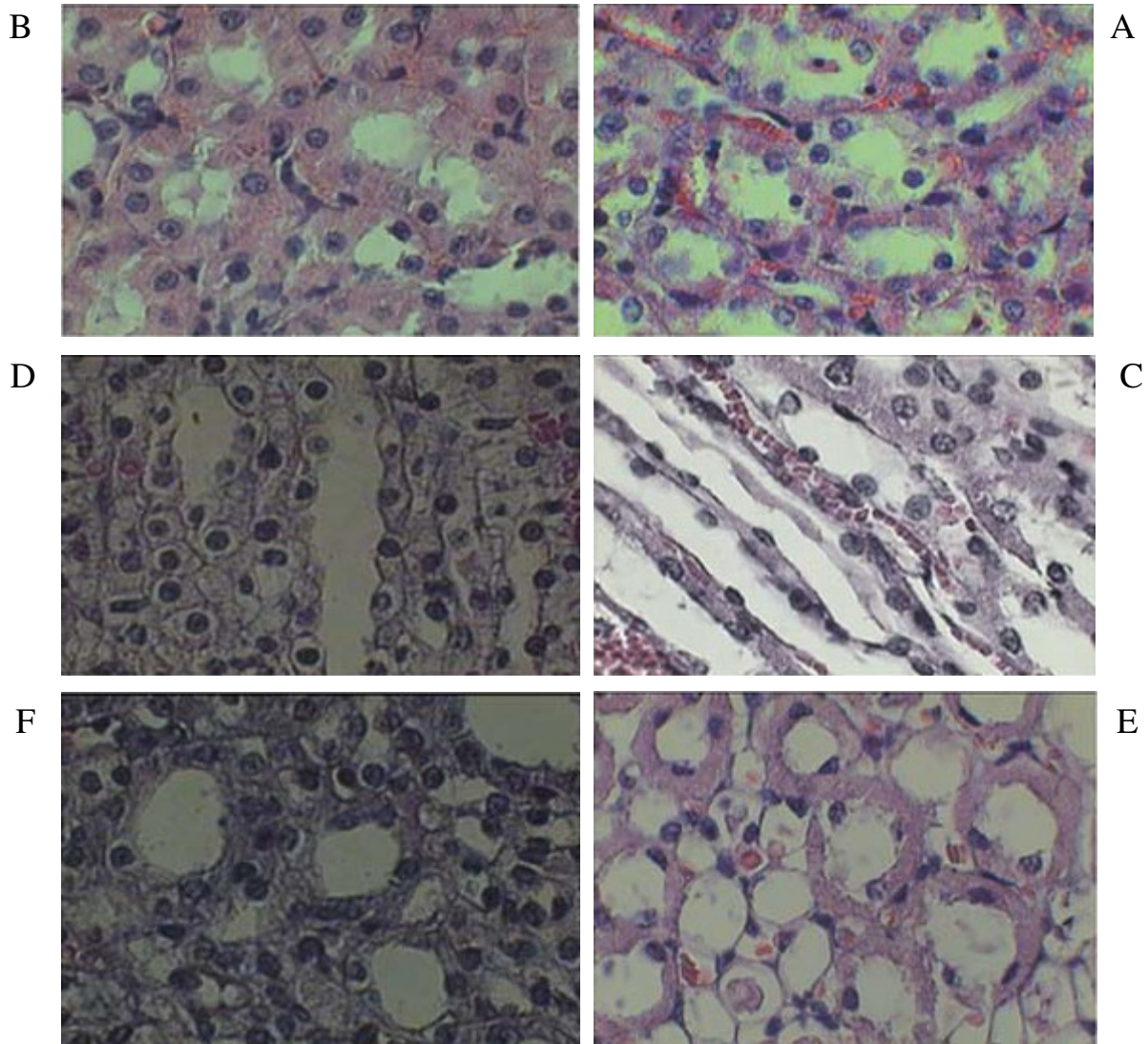
۲- گروه طبیعی: که هیچ ماده‌ای به آن تزریق نشد.

۳- گروه سولفورمستارد ۱ (HD1): که سولفورمستارد $0/4$ ٪ در ناحیه ایلیاک چپ به صورت زیرصفاقی تزریق شد.

۴- گروه سولفورمستارد ۲ (HD2): که سولفورمستارد $0/8$ ٪ در ناحیه ایلیاک چپ به صورت زیرصفاقی تزریق شد.

۵- گروه سولفورمستارد ۳ (HD3): که سولفورمستارد $1/6$ ٪ در ناحیه ایلیاک چپ به صورت زیرصفاقی تزریق شد.

در روز مورد نظر برای هر گروه زمانی، بعد از وزن‌کشی، حیوان به داخل ظرف شیشه‌ای دهان‌گشاد و درپوش‌داری که محتوی مقداری پنبه آغشته به کلروفرم بود، انتقال یافت. حیوان بعد از کشته شدن، بلافاصله به میز تشریح منتقل شد. با یک برش طولی در خط وسط شکم از ناحیه گزیفونید تا ناحیه لگن، شکم حیوان باز شد و بعد از کنارزدن احشای داخل شکم، کلیه‌های حیوان به طور کامل برداشته شدند. سپس کلیه‌ها به داخل ظروف مربوطه منتقل شدند و به مدت ۲۴ ساعت در فرمالین ۱۰٪ قرار گرفتند. بعد از ۲۴ ساعت، نسبت به تعویض مایع ثبوت‌دهنده اقدام شد و به منظور نفوذ مایع در تمام قسمت بافت کلیه، در هنگام تعویض مایع، برش طولی در بافت داده شد. برای ممانعت از سختی بافت کلیه بعد ۴۸ ساعت نوع مایع ثبوت‌دهنده، تعویض و از الکل ۷۰٪ استفاده شد و نمونه برای مرحله بعد آماده شد. بعد از ثبوت بافت، مرحله گردش بافت بود. در این مرحله نمونه‌ها هر کدام با مشخصه شماره بافت در سبد قرار داده شدند. نمونه‌ها به صورت بافت کلیه که از وسط با یک برش طولی دونیم شده بود، جای داده شدند. عملیات پاساژ بافتی توسط دستگاه انجام شد. در این مرحله نمونه‌های بافتی توسط پارافین مذاب در قالب‌های آلومینیومی مناسب قالب‌گیری شدند و بدین‌منظور قالب مورد نظر برای هر نمونه روی یک شیشه تمیز صیقلی قرار گرفت و لایه نازکی از پارافین ذوب‌شده توسط دستگاه پارافین اسپنسر در داخل قالب ریخته شد. سپس نمونه بافتی مورد نظر توسط پنس در درون قالب قرار گرفت و قالب توسط پارافین مذاب پر شد. پس از سرد شدن



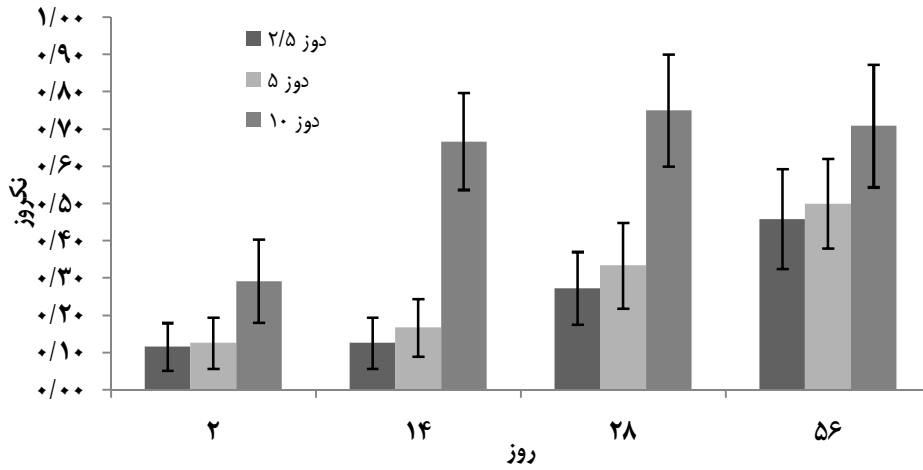
شکل ۱) تصاویر بافت کلیوی در گروه‌های مختلف و مرگ سلولی در گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل و طبیعی دیده می‌شود (بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اوتوزین). A: نمونه تجربی با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مدت ۴ هفته، B: نمونه کنترل با تزریق تیروئید، C: نمونه تجربی با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مدت ۸ هفته، D: نمونه طبیعی پس از ۸ هفته، E: نمونه تجربی با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مدت ۸ هفته، F: نمونه طبیعی پس از ۸ هفته.

تجربی دارای اختلاف معنی‌دار بین همه گروه‌ها نبود. اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم با گروه ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۵۶ روز و همچنین بین گروه ۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۲ روز و ۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۵۶ روز با گروه‌های ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۲ روز و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۵۶ روز برقرار بود (نمودار ۱). در موقعیت‌هایی که شدت غلظت عامل موستارد زیادتر بود یا آن که مدت دوره درگیری افزایش می‌یافت، این افزایش از نظر آماری معنی‌دار بود.

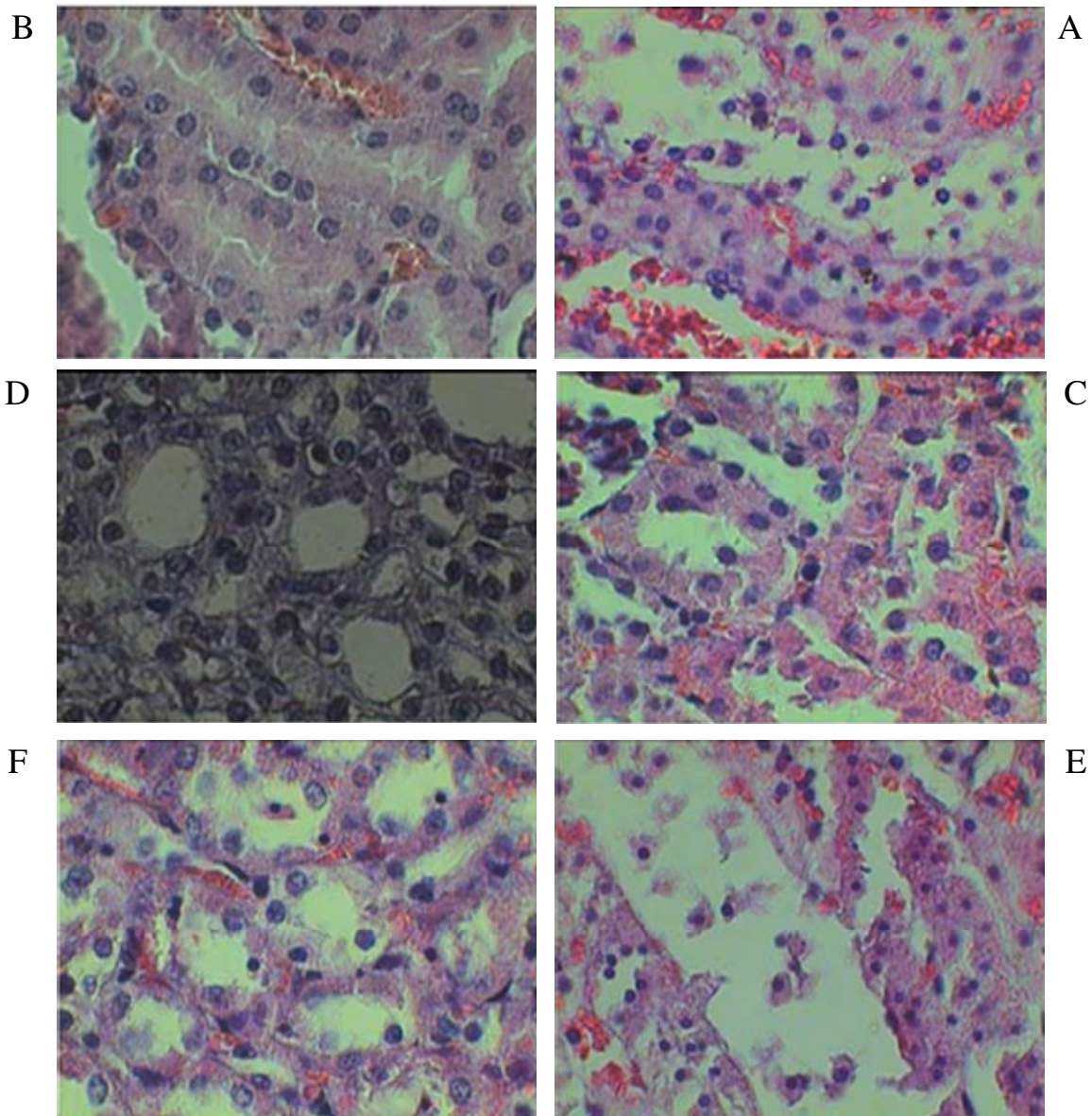
ریزش سلولی در نمونه‌های مورد بررسی به همراه افزایش شدت عامل خردل بیشتر شد (شکل ۲). بیشترین نوع ریزش سلولی از نوع درجه + (خفیف) بود. افزایش میزان ریزش سلولی با بیشتر شدن مدت زمان درگیری حیوان با عامل خردل رابطه مستقیم داشت. ریزش سلولی از نوع درجه +++ (زیاد) در نمونه‌هایی که با عامل خردل با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آلوده شده بودند، وجود داشت. این درجه ریزش

۲ روز و ۲ هفته مشاهده نشد. نکروز سلولی در نمونه‌ها با غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در دوره‌های ۴ هفته و ۸ هفته با شدت + (خفیف) قابل رویت بود. افزایش میزان مرگ سلولی در دوزهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دیده شد، ولی تراکم سلول‌های مرده با افزایش میزان غلظت عامل موستارد قابل توجه نبود. تراکم مرگ سلولی با افزایش غلظت عامل خردل در دوره‌های ۴ و ۸ هفته‌ای افزایش می‌یافت. مرگ سلولی از نوع درجه +++ (شدید)، در هیچ‌کدام از نمونه‌ها دیده نشد. مرگ سلولی از نوع درجه +++ (زیاد) در نمونه‌های تجربی با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و در دوره ۸ هفته‌ای بود.

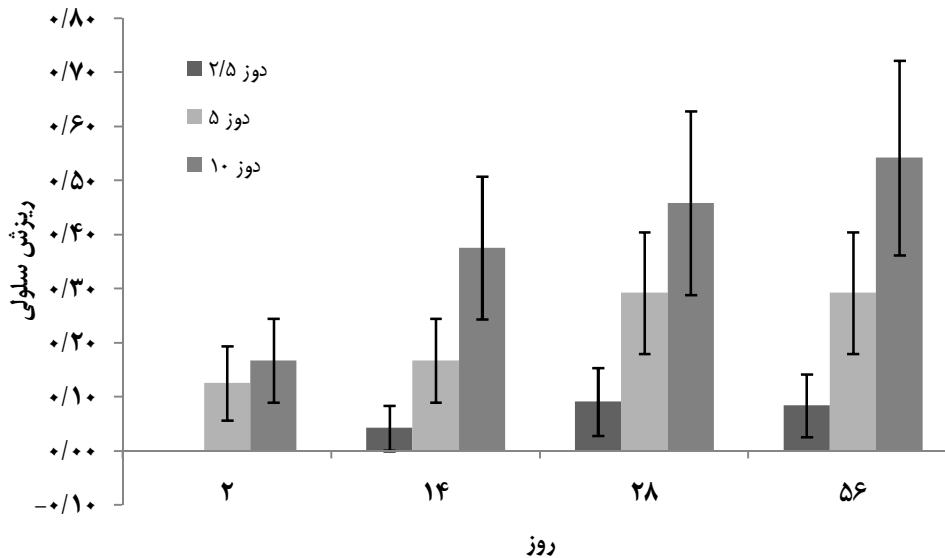
براساس بررسی‌های آماری نیز میزان مرگ سلولی با افزایش غلظت عامل خردل افزایش می‌یافت و این افزایش تعداد سلول‌های نکروز شده، با افزایش دوره درگیری بیشتر می‌شد. مقایسه نتایج تجربی با گروه‌های شاهد و نمونه‌های طبیعی نشان داد که مرگ سلولی در نمونه‌های تجربی اتفاق افتاده است. سلول‌های مرده در نمونه‌های



نمودار ۱) بررسی میزان نکروز ایجادشده در نمونه‌های مورد بررسی به‌همراه افزایش شدت عامل خردل.



شکل ۲) تصاویر بافت کلیوی در گروه‌های مختلف و ریزش سلولی در گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل و طبیعی دیده می‌شود (بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اتوزین). A: نمونه کنترل در مدت ۸ هفته تزریق تیروژن، B: نمونه تجربی با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مدت ۴ هفته، C: نمونه تجربی با غلظت ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مدت ۲ هفته، D: نمونه طبیعی پس از ۸ هفته، E: نمونه تجربی با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مدت ۸ هفته، F: نمونه تجربی با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مدت ۴ هفته.



نمودار ۲) بررسی میزان ریزش سلولی ایجاد شده در نمونه‌های مورد بررسی به همراه افزایش شدت عامل خردل

پروتئین‌های تیول را کنترل می‌کنند، مهار می‌شوند و سطح کلسیم داخل سلولی افزایش می‌یابد. سطوح بالای کلسیم در سلول با افزایش فعالیت پروتئازها، فسفولیپازها و اندونوکلیتازها باعث شکست غشا و اسکلت سلول و ترکیبات سیتوکین و DNA می‌شود که این عمل منجر به ایجاد پروسه التهاب در سلول و در نتیجه مرگ سلول می‌شود [۶، ۷]. تغییرات بافتی و وجود مرگ سلولی در نمونه‌های تجربی مطالعه حاضر، نظر آقای دکتر مهرانی در مورد روند بررسی تحقیق را تایید می‌کند [۷].

در بررسی ریزش سلولی، جدا شدن سلول‌های اپی‌تلیال از دیواره لوله‌های ادراری و رها شدن در مدخل لوله مطرح است. ریزش سلول‌های اپی‌تلیال از دیواره لوله‌های ادراری، از آثار تزریق عامل موستارد در نمونه‌های تجربی بود و همین مشاهدات در بررسی‌های انجام شده محققان دیگر مانند گولسن و همکاران [۹] دیده شد. در استنشاق دوزهای بالای سولفورموستارد، سلول‌های اپی‌تلیال دستگاه تنفسی فوقانی ریزش پیدا می‌کنند که همراه با ادم اطراف برونش، پرخونی عروق خونی، ارتشاح سلول‌ها در لایه ساب‌موکوس، واکوئل شدن و به هم ریختگی سیتوپلاسم و ساختار هسته است که باعث خونریزی ریوی، ادم ریوی، نقص تنفسی و علائم شبیه سندروم دیسترس تنفسی می‌شود. وجود سلول‌های اپی‌تلیال در فضای لوله ادراری، دال بر ریزش سلولی است که در مطالعه موجود مشاهده شد. این مطلب با مشاهدات قانعی و همکاران همخوانی دارد [۱۱].

نتیجه‌گیری

در تمام گروه‌های تجربی، نکروز در سلول‌های اپی‌تلیالی و همچنین ریزش سلول‌های اپی‌تلیالی در مجرای لوله ادراری مشاهده می‌شود. لکن این میزان نسبت به گروه کنترل فقط در گروه ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خردل به مدت ۵۶ روز دارای اختلاف معنی‌دار است.

سلولی در نمونه‌هایی که با غلظت ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عامل خردل آلوده شده بودند، دیده نشد. شدت ریزش سلولی از نوع درجه ++ (متوسط) در آلودگی با غلظت ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده شد و میزان آن در نمونه‌های ۸ هفته‌ای و بعد از آن در نمونه‌های تجربی ۴ هفته‌ای بیشتر از بقیه بود.

براساس بررسی آماری نیز با افزایش غلظت عامل خردل، میزان ریزش سلولی افزایش می‌یافت. با افزایش مدت‌زمان درگیری در نمونه‌ها تغییرات ریزش سلول اپی‌تلیال نیز افزایش یافت. اختلاف آماری بین گروه‌های تجربی ۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۱۴ روز با گروه ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۱۴ روز و گروه ۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۵۶ روز با گروه ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۵۶ روز معنی‌دار بود (نمودار ۲).

بحث

نکروز سلولی یکی از آثار تخریبی عامل خردل است که در سلول‌های اپی‌تلیال لوله‌های ادراری می‌تواند وجود داشته باشد. دیکلوفناک از جمله سمی‌ترین داروهایی است که در جریان متابولیسم سلولی وارد عمل می‌شود. در دوزهای بالای این دارو، تغییرات دژنراسیون و مرگ سلولی به صورت نقطه‌ای مشاهده شده است. در بررسی انجام شده، مرگ سلولی مشاهده شد و با افزایش غلظت عامل خردل، مرگ سلولی در گروه تجربی روند افزایشی داشت. نتایج بررسی مطالعه حاضر با مطالعه گولسن و همکاران هماهنگی دارد [۹]. بررسی‌های انجام شده در تحقیق نشان داد که روند مرگ سلولی، غیر از شدت غلظت عامل مخرب، تحت تاثیر دوره گرفتاری است و با مطالعات استاد و همکاران [۱۰] همسو است.

سولفورموستارد با گلوپاتینون موجود در سلول واکنش داده و موجب کاهش میزان آن در بافت می‌شود و در نتیجه آنزیم‌هایی که

- 6- Levitt JM. Low-dose sulfur mustard primes oxidative function and induces apoptosis in human polymorphonuclear leukocyte. *J Int Immunopharmacol*. 2005;3:747-56.
- 7- Mehrani H, Keshavarz M. Medical aspects of chemical defense. Tehran: Golban Publication; 2001. [Persian]
- 8- Rick G, Schnellmann K, Kelly J. Atlas of diseases of the kidney: Pathophysiology of nephrotoxic acute renal failure. Colorado: University of Colorado; 1999.
- 9- Gulsen A, Alparsian G, Ekrencicek S. Histopathologic change in liver and renal tissue induced by different doses of diclofenac sodium in rat. *Turk Jvet Anim Sci*. 2003;27:1131-40.
- 10- Ostad SN, Kebriaeezadeh A, Zarekamali R, Abdollahi M, Marzban H, Akhgari M. The protective effect of indomethacine on ocular damage of sulfur mustard in the rabbit eye. *J Med Is Res*. 2001;14(4):385-93.
- 11- Ghanei M, Akbari MF, Mirmohammad M, Aslani J. Tracheobrochomalacia and air trapping after mustard gas exposure. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173:304-9.
- 1- Kehe K, Szinicz L. Medical aspect of sulfur mustard poisoning. *J Toxicol*. 2005;214:198-209.
- 2- Ray R, Simbulan-Rosenthal CM, Keyser BM, Benton B, Anderson D, Holmes W, et al. Sulfur mustard induces apoptosis in lung epithelial cells via a caspase amplification loop. *Toxicology*. 2010;271(3):94-9.
- 3- Vijayarghavan R. Acute toxiclty studies of CC2 and effective chemical decontaminant of sulfur mustard in hydrophltic formulation. *Indian J Pharmacol*. 2002;340:321-31.
- 4- Emad A, Rezinan GH. The diversity of the effects of sulfur mustard gas inhalation on respiratory system 10 years after a single, heavy exposure: Analysis of 197 cases. *J Chest*. 1997;112:734-8.
- 5- Omaye ST, Elsayed NM, Kalin GJ, Korte DW. Metabolic change in the mouse kidney after injection of butyl-2-choroethyl sulfide. *J Toxicol Environ Health*. 1999;33(1):19 - 27.