

اثر سولفورمستارد بر سلول‌های جامی ایلئوم موش بزرگ صحرائی

حسین بهادران^{۱*}، حسین دشت نورد^{۲*}، محمد حسین اسدی^{۳*}، حسین ایمانی^{۴*}،
همایون صدرایی^{۵*}، غلامرضا کاکا^{۶*}، محمود مفید^{۷*}، حسین مهدوی نسب^{۸*} و
عباس محمودزاده^{۹*} Ph.D.

آدرس مکاتبه: * دانشگاه علوم پزشکی بقیه... «ع» - دانشکده پزشکی - گروه آناتومی - تهران - ایران

** دانشگاه علوم پزشکی بقیه... «ع» - دانشکده پزشکی - گروه میکروبیولوژی - تهران - ایران

تاریخ اعلام وصول: ۱۳۸۳/۸/۱۶ تاریخ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۳/۱۲/۶ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۱۳۸۴/۲/۸

خلاصه

مقدمه: گاز خردل، سیتوتوکسیک و ژنوتوکسیک است. این ماده باعث ضایعات نکرولی سلول‌های پوششی دستگاه تنفس و گوارش می‌گردد. اسهال شدید و کاهش تعداد سلول‌ها و وزن بدن را به همراه دارد. نظر به اهمیت ایلئوم در جذب یون‌ها و الکترولیت‌ها و نیز نقش سلول‌های جامی، بر آن شدید تا اثر خردل بر روی این سلول‌ها را مورد مطالعه قرار دهیم.

روش کار: در این مطالعه تعداد ۶۶ رأس موش بالغ از نژاد Albino Nmri به وزن 20 ± 200 گرم انتخاب و به‌طور تصادفی به ۵ گروه تقسیم شدند. گروه اول کنترل، گروه دوم دریافت‌کننده حلال، به‌عنوان گروه شام و ۳ گروه دیگر به‌ترتیب مقدار ۲/۵، ۵ و ۱۰ mg/kg گاز خردل به‌صورت تزریق داخل صفاقی (IP) دریافت کردند. در روزهای دوم و پانزدهم (هفته دوم) و پنجاه و هفتم (هفته هشتم) موش‌ها کشته و تشریح شدند. سپس از ایلئوم آنها نمونه‌برداری انجام شد. از نمونه‌ها پس از فیکس و قالب‌گیری، برش‌های متوالی به ضخامت $5 \mu\text{m}$ تهیه و با هماتوکسیلین اتوزین و Alician blue رنگ‌آمیزی شد. برای بررسی از Eye piece و ست نرم‌افزاری و سخت‌افزاری Motic استفاده گردید.

نتایج: این تحقیق نشان داد، خردل باعث کاهش وزن شدید در کوتاه مدت شده ولی در دراز مدت، میزان کاهش روند نزولی دارد. همچنین باعث ریزش پرزها و ارتشاح سلول‌های آماسی شده و نیز بر روی سلول‌های جامی بافت پوششی ایلئوم اثر کرده و کاهش آن را به دنبال دارد ($P < 0.001$).

۱- استادیار - دانشگاه علوم پزشکی بقیه... «ع» - (نویسنده مسئول)

۲- استادیار - دانشگاه علوم پزشکی بقیه... «ع»

۳- دانشیار - دانشگاه علوم پزشکی بقیه... «ع»

۴- استادیار - دانشگاه علوم پزشکی بقیه... «ع»

۵- استادیار - دانشگاه علوم پزشکی بقیه... «ع»

۶- عضو هیئت علمی - دانشگاه علوم پزشکی بقیه... «ع»

۷- عضو هیئت علمی - دانشگاه علوم پزشکی بقیه... «ع»

۸- کارشناس ارشد - دانشگاه علوم پزشکی بقیه... «ع»

۹- دانشیار - دانشگاه علوم پزشکی بقیه... «ع»

بحث: کاهش سلول‌های جامی در گروه ۲/۵ mg/kg و زمان بیست و چهار ساعت معنی‌دار نبود که احتمالاً به دلیل اثرات کم سمیت این دوز است. اما تعداد سلول‌های جامی در گروه‌های ۵ و ۱۰ mg/kg با زمان ۲۴ ساعت در مقایسه با گروه شم کاهش نشان داد که این معنی‌دار بود ($p < 0/001$). این کاهش به علت مرگ سلول‌های ریشه‌ای و توقف تقسیم سلولی است. با توجه به نقش اساسی سلول‌های ریشه‌ای در تولید سلول‌های گابلت و در نتیجه محافظت از سلول‌های پوششی، این موضوع باید بیشتر مورد بررسی قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: سولفورموستارد، ایلئوم، سلول جامی، موش بزرگ صحرائی

مقدمه

نیست. به همین دلیل در مورد عوارض تأخیری سولفورموستارد در انسان شناخت کمتری وجود دارد. از آنجا که جانبازان شیمیایی که با سولفورموستارد تماس داشته‌اند، با مشکلات متعدد تنفسی، گوارشی و خونی روبرو بوده و در اثر عوارض دیررس این گاز جان خود را از دست می‌دهند [۱۲، ۱۳]، بررسی عوارض دیررس آن ضروری به نظر می‌رسد.

مطالعات نشان می‌دهد، سولفورموستارد پس از تزریق در بافت چربی، کلیه، کبد، ریه، معده و روده کوچک دیده شده است [۱۴]. در مشاهدات میکروسکوپ نوری گزارش شده است، ۶ ساعت پس از تماس با سولفورموستارد اپی‌تلیوم تراکوبرونکیال تخریب شده و پس از ۲۴ ساعت واکنش سلول‌های آماسی و ارتشاح آن همراه با تخریب سلول‌های موکوسی و گابلت گزارش شده است [۱۵]. همچنین ۲۴ ساعت پس از تزریق داخل صفاقی (IP) یا وریدی سولفورموستارد در موش‌های صحرائی، ضایعات شدید گوارشی مانند التهاب و ادم مخاط، ریزش پرزها، ضایعات نکروزی سلول‌های پوششی، توقف تقسیم سلولی، کاهش وزن و در نهایت مرگ موش‌ها گزارش شده است [۱۵]. اثرات سولفورموستارد بر دستگاه گوارش به صورت تهوع، استفراغ، بی‌اشتهایی، اسهال و زخم‌های متعدد در لوله گوارش بوده که به دنبال آن میکروارگانیسم‌ها وارد مخاط و زیر مخاط می‌شوند [۱۶، ۱۷، ۱۸].

نظر به اهمیت ایلئوم در جذب مواد، به خصوص جذب یون‌ها، الکترولیت‌ها و آب [۱۹] و نیز نقش سلول‌های گابلت که کار تسهیل حرکت مواد و حفاظت مخاط را به عهده دارند [۲۰]، بر آن شدیم که اثر سولفورموستارد بر سلول‌های گابلت ایلئوم را بررسی نماییم.

در جنگ جهانی اول (WWI) از عوامل شیمیایی به‌عنوان سلاح تاکتیکی و تخریبی استفاده شد. در این جنگ از سولفورموستارد به‌علت خصوصیت تاول‌زایی آن بیشتر از سایر عوامل استفاده گردید [۱]. از آغاز جنگ جهانی اول تا پایان آن ۴۰۰/۰۰۰ بار گاز سولفورموستارد علیه نیروهای فرانسه استفاده شده است [۲]. مرگ و میر در روزهای اول و دوم به علت آسیب سیستم تنفسی و برونکوپنومونی بوده است [۳]. مصر در سال‌های ۶۷-۱۹۶۳ علیه یمن از سولفورموستارد استفاده کرده است [۴]. از سال ۱۹۸۴ در جنگ تحمیلی، عراق بارها علیه ایران از این گاز در جبهه‌ها و شهرهای مرزی استفاده کرده است [۵]. گزارش‌های متعددی از آلودگی به این ماده بر روی کارگران شاغل در محل‌های مختلف تولید این ماده [۶] و همچنین کارمندان شاغل در بخش‌های تحقیقاتی مرتبط با گاز سولفورموستارد [۷] منتشر شده است. از طرفی این ماده به‌عنوان یک سلاح تروریستی نیز مطرح است [۶]. در جنگ جهانی دوم (WWII) نیز از این ماده استفاده شده است. سولفورموستارد به‌عنوان عامل آکیل‌کننده DNA که در دوز کم سیتوتوکسیک است، شناخته شده است. در حالی که نیتروژن‌موستارد را به‌عنوان عامل ژنوتوکسیک می‌شناسند که می‌تواند موتاسیون ایجاد کند [۸، ۹]. در آزمایشگاه سرطان‌زایی هر دو ماده (بر روی موش) نشان داده شده است. تومور در موش‌های آلوده به سولفورموستارد نسبت به گروه کنترل بیشتر بوده است [۱۰]. تزریق زیر جلدی سولفورموستارد در محل تزریق، نئوپلاسم ایجاد نموده است [۱۰، ۱۱].

اگرچه اطلاعات مفیدی از اثرات حاد سولفورموستارد در دست می‌باشد، ولی در مورد اثرات دیررس آن اطلاعات کافی در دست

مواد و روش‌ها

در این تحقیق تعداد ۶۶ رأس موش بالغ از نژاد Albino Nmri به وزن 20 ± 20 گرم انتخاب و به‌طور تصادفی در ۵ گروه تقسیم و در حیوان‌خانه تحت شرایط یکسان از نظر غذا، نور و حرارت نگهداری شدند. چون سولفورموسستارد در حلال‌های آلی مانند الکل و اتر محلول می‌باشد، ابتدا سولفورموسستارد در حلالی به نام بافر تیرودوز حل گردید. محلول تیرودوز به‌صورت زیر آماده شد: سدیم کلراید $0.8g$ ، کلسیم کلراید $0.2g$ ، گلوکز $g/3$ و سدیم سولفات $0.05g$ در آب مقطر حل نموده و به حجم $100^{\circ}C$ رسانده شد. آنگاه در دمای ۴ درجه، گلیسرول ۳۷ درصد به مقدار 0.5 میلی‌لیتر به آن اضافه شد.

یک گروه از موش‌ها به‌عنوان کنترل، هیچ ماده‌ای دریافت نکردند. گروه دوم به عنوان شم (شاهد) فقط حلال دریافت کرد. به ۳ گروه باقیمانده با نام گروه تجربی، دوزهای $2/5$ ، 5 و 10 mg/kg سولفورموسستارد به‌صورت داخل صفاقی (IP) تزریق گردید. در هر دوز موش‌ها به گروه‌های ۲۴ ساعت، دو هفته و هشت هفته تقسیم شدند (جمعاً ۹ گروه). پس از سپری شدن زمان مورد نظر، موش‌ها کشته شده و مورد تشریح و نمونه‌برداری قرار گرفتند. سپس مراحل هیستوتکنیک و قالب‌گیری انجام گرفت. از نمونه‌ها، برش‌های متوالی به ضخامت $5 \mu m$ تهیه و با هماتوکسیکین‌آئوزین و Alicianblue رنگ‌آمیزی شدند.

برای بررسی کمی - کیفی و مورفولوژیک از میکروسکوپ نواری Zenit مجهز به گراتیکول چشمی (Holland Eye Piece HWF-I OX) و ست نرم‌افزاری و سخت‌افزاری motic استفاده گردید. نتایج حاصل از این تحقیق با آزمون T-test مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج

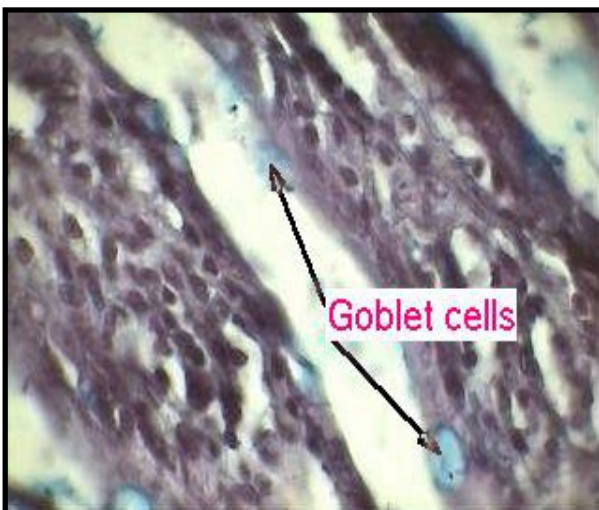
موش‌های گروه‌های آزمایش، گوشه‌گیر و بی‌اشتها بوده و نیز کاهش وزن داشتند. این پدیده در همه دوزها و در دو هفته چشمگیر بود. ولی در زمان هشت هفته با همین دوزها از میزان آن کاسته شد. از نظر هیستوپاتولوژی التهاب، ادم، پرخونی در لامیناپروپریای مخاط و بافت همبند همراه با بهم خوردن نظم سلولی دیده شد. پرزهای

ایلئوم ریزش داشت و از نظر اندازه (ارتفاع و ضخامت) نامنظم بودند. عروق لنفاوی آنها متسع شده و فواصل این عروق از هم نامنظم بود. ناحیه زیر مخاط و کوریون تحت نفوذ سلول‌های آماسی قرار گرفته بود (شکل ۱).



شکل ۱: (گروه کنترل) سلول‌های جامی شکل ناحیه پرزهای ایلئوم (محل فلش) دیده می‌شود. نظم سلولی و تراکم سلول‌های ناحیه لامیناپروپریا طبیعی است.

پلاک‌های پیر (Payer's patches)، علاوه بر داشتن سلول‌های لنفوسیت به میزان زیاد دارای سلول‌های پلی‌مورف و نکروتیک بود (شکل ۲).



شکل ۲: گروه 5 mg/kg هشت هفته‌ای - تعداد سلول‌های جامی شکل (محل فلش) نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است. بهم ریختگی و ریزش سلولی و وجود سلول‌های التهابی در لامیناپروپریا مخاط دیده می‌شود.

هشت هفته کاهش نشان داد. این کاهش در مقایسه نسبت به گروه شام و با گروه دوز ۲/۵ mg/kg و در زمان بیست و چهار ساعت معنی‌دار بود. در گروه‌های با دوز ۵ و ۱۰ mg/kg زمان دو هفته و هشت هفته در مقایسه با گروه تجربی تعداد سلول‌های جامی کاهش نشان داد. تعداد سلول‌های جامی در هر سه روز و روزهای مشابه (بجز دوز ۲/۵ mg/kg با زمان ۲۴ ساعت) نسبت به گروه شام کاهش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.001$).

سلول‌های جامی در گروه‌های تجربی نسبت به شام کاهش نشان داد. در گروه ۲/۵ mg/kg با زمان ۲۴ ساعت این کاهش در مقایسه با شام معنی‌دار نبود. ولی در دوزهای ۵ و ۱۰ mg/kg و همین زمان کاهش تعداد سلول‌های جامی در مقایسه با گروه شام معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه تعداد سلول‌های جامی در گروه کنترل و شام نسبت به هم تفاوت معنی‌داری نداشت ($P < 0.001$). تعداد سلول‌های جامی در گروه‌هایی که دوز ۲/۵ mg/kg دریافت داشتند، در زمان دو هفته و

جدول ۱: میانگین سلول‌های جامی در گروه‌های مختلف آزمایشی

دوز	شام	۲/۵mg/kg			۵mg/kg			۱۰ mg/kg		
		شام	روز دوم	روز ۱۵	روز ۵۷	روز دوم	روز ۱۵	روز ۵۷	روز دوم	روز ۱۵
میانگین تعداد سلول	۱۲	۱۱/۸	***۷/۶۲	***۷/۰۸	***۸/۱۶	***۷/۴۱	***۶/۲۶	***۷/۵۰	***۶/۵۱	***۶/۳۷

*** ($P < 0.001$)

آماسی تک‌هسته‌ای و توقف تقسیم سلولی می‌باشد. این ضایعات وابسته به دوز و زمان است. این مشاهدات در گزارش محققین دیگر نیز آمده است [۱۵، ۱۸]. کاهش تعداد سلول‌های جامی در گروه ۲/۵ mg/kg و زمان بیست و چهار ساعت معنی‌دار نبود که احتمالاً به دلیل کم بودن اثر این دوز است. اما تعداد سلول‌های جامی در گروه‌های ۵ و ۱۰ mg/kg با زمان ۲۴ ساعت در مقایسه با گروه شام کاهش نشان داد که این کاهش معنی‌دار بود ($P < 0.001$). در گروه‌های با دوز ۲/۵ و ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر حسب کیلوگرم و در زمان‌های دو هفته و هشت هفته از نظر آماری تعداد این سلول‌ها در مقایسه با گروه شام کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0.001$). این کاهش احتمالاً به علت مرگ سلول‌های ریشه‌ای و توقف تقسیم سلولی است [۲۳]. گروه‌های تجربی نیز از نظر کاهش سلولی با هم تفاوت داشتند. مثلاً در دوز ۵ mg/kg و با زمان ۲۴ ساعت، دو هفته و ۸ هفته کاهش سلولی روندی خاص داشت که وابستگی آن را به زمان نشان می‌دهد. این کاهش معنی‌دار بود. این پدیده نشان می‌دهد، سلول‌های گابلت بازسازی نشده و با توجه به این که میانگین دوره تجدید و نوسازی سلول‌های پوششی روده حدود ۴ روز است [۲۰]، سلول‌های جامی

بحث

در این مطالعه موش‌ها به طریق IP (تزریق داخل صفاقی) و با دوزهای ۲/۵، ۵ و ۱۰ mg/kg در معرض سولفورموستارد قرار داده شدند. عوارض بالینی آن به صورت انزوا، بی‌اشتهایی و کاهش وزن بود. کاهش وزن در تمامی گروه‌های تجربی، ۲۴ ساعت پس از تزریق مشهود بوده و با افزایش دوز، کاهش وزن نیز بیشتر مشاهده شد. اما در زمان هشت، هفته کاهش وزن به شدت گروه دو هفته نبود. نتایج حاصل با گزارشات قبلی محققین هم‌خوانی داشت [۱۱، ۲۱]. دلیل احتمالی افزایش وزن بدن در گروه‌های هشت هفته به علت تقلیل تأثیر سولفورموستارد می‌باشد. زیرا مطالعات نشان می‌دهد، نیمی از سولفورموستارد، پس از تزریق، در بیست و چهار ساعت اول وارد ادرار می‌شود و بخشی از نیمه باقیمانده نیز در طول یک هفته به تدریج دفع می‌شود [۲۲]. با دفع سولفورموستارد بی‌اشتهایی حیوان کاهش پیدا کرده و میل به مصرف غذا از یک طرف و ترمیم سلول‌های پوششی مخاط از طرف دیگر، دلیل افزایش وزن در طول هشت هفته می‌شود. مشاهدات ما نشان داد که ضایعات میکروسکوپی سولفورموستارد در ایلئوم به صورت ادم، پرخونی، ریزش پرزها، نکروز، ارتشاح سلول‌های

پس از تخریب اساسی است، به نظر می‌رسد، سولفورموستارد با از بین بردن سلول‌های ریشه‌ای [۲۳، ۲۴]، باعث کاهش تعداد سلول‌های جامی و در نتیجه باعث جلوگیری از نقش محافظتی این سلول‌ها شده که این عمل خود به تخریب بیشتر سلول‌های اپی‌تلیوم پوششی کمک می‌نماید.

پس از گذشت دو هفته تجدید نشده‌اند. این نتایج با گزارشات بالینی بلالی همسو است [۱۶].

بدین ترتیب اپی‌تلیوم روده تخریب شده و کار فیزیولوژیک جذبی ایلئوم مختل می‌شود. از آنجا که نقش سلول‌های گابلت در محافظت و جلوگیری از تخریب و نیز بازسازی اپی‌تلیوم پوششی

منابع

- 1- World Health organization. Health aspects of chemical and Biological weapons. Geneva switzed: world health organization; 1970. p.23-4.
- 2- Pechura CM, Rall DP. Veterans at Risk, the health Effects of Mustard Gas and lewisite. Washington, DC: National Academy Press 1983;9:29-33,53-54.
- 3- Papirmeister B, Feister AJ, Orbinson SI. Medical defense against mustard Gas: Toxic mechanism and pharmacological implications. Boca raton, FI: Press 1991;31:102.
- 4- Medema J. Mustard Gas. The science of H. Nucl. Biol chem Def Technol Int 1986;1(4): 66-71.
- 5- Kadivar H, Adams S. Treatment of chemical and biological warfare injuries: Insights derived from the 1984 iraqi attack on Majnoon Island. Mil Med 1991;156:171-177.
- 6- Baronian C. Chemical stockpile disposal program: draft programmatic environmental impact statement. Program manager for chemical demilitarization. Aberdeen proving ground, MD. 1984.
- 7- Marshall E. Iraq's chemical warfare. Case Proved Sci 1984;224:130-2.
- 8- Heston WE, Levillan WD. Pulmonary tumors in strain a mice exposed to Mustard gas. Proc. Soc Exp Biol 1953;82: 457-460.
- 9- Heston WE. Carcinogenic action of the mustard. J Nat Cancer Inst 1950;11: 415-423.
- 10- Heston WE. Occurrence of tumors in mice injected with sulfur mustard and nitrogen mustard. J Nat 1953;14:131-140.
- 11- Sasser LB, Cuching JA and Dacre JC. Dacre. Two generation reproduction study of sulfur mustard in Rats. J Re Productive Toxicol 1996; 311-319.
- ۱۲- پژوهی محمد، زهیر محمدحسن، شیخ‌الاسلامی فرزانه. بررسی اثرات سولفورموستارد بر میزان برخی از هورمون‌ها در مجروحین شیمیایی جنگ تحمیلی عراق علیه ایران. مجله طب نظامی پاییز و زمستان ۱۳۷۹. شماره ۲. صفحات: ۱۰۵-۱۰۱.
- ۱۳- حلی‌ساز محمدتقی. بررسی نقش عوامل جنگی شیمیایی در ایجاد نوروپاتی. مجله طب نظامی ۱۳۸۲. شماره ۸. صفحه: ۲۶-۳۹.
- 14- Maisonneuve A, Callebat I, Debordes L, Coppet L. Distribution of [14c] sulfur mustard in rats after intravenous exposure. Toxicol Appl Pharmacol 1994 Apr;125(2):281-7.
- 15- Pant SC, Vijayaraghavan R. Histomorphological and histochemical alterations following short-term inhalation exposure to sulfur mustard on viscera organs of mice. Biomed Environ Sci 1999 Sep;12(3): 201-13.
- 16- Balali M. Clinical and laboratory finding in the iranian fighters with chemical gas. Arch Beges 1984 (suppl);102: 254-9.
- 17- Smith WD and dunn MA. Medical defense agent blistering chemical warfare agents. Ach Dermato; 1943. P.121-7.
- 18- Mandle M and Gibson W. Clinical manifestation and treatment of gas poisoning JAMA 1977;69;70-7.
- 19- Lenonar R, Jonson LR. Gastrointestinal physiology, sixth edition, mosby, 2001. p.143-153.
- 20- Bloom and fawcett. A text book of histology, 12 Edition, chapman & Hall; 1996.p.620-631.
- 21- Graef I. The clinical pathologic effects of the nitrogen and sulfur mustard in laboratory animals. AmJ pathol 1948;24: 1-17.
- 22- Canellt AF. Contributo alla conscenza dell imtossicaziona a cute yprit in particolare suo reporto anatomopatologico. Rivista os Peda. Itali 1918;8: 2-7.
- 23- Rovberts J. The metabolism of Mustard gas and related compounds. Biochem. Pharma 1968;12:1329-34.
- 24- Satu M and somani SM. Chemical warfare agents. Report Toxicol 1993;10(4):17-56.