

مقایسه آثار محافظتی هگزامتیلن تترآمین و N-استیل - سیستین بر عوارض پاتولوژیک سولفور موستارد در سلول‌های فیبروبلاست پوست انسانی رده HF2FF با استفاده از میکروسکوپ الکترونی

مهدی صابری* *PhD*، علی زارعی محمودآبادی^۱ *PhD*، زیلا پیرزاد جهرمی^۲ *MSc*

*گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه...^(ع)، تهران، ایران

^۱ گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه...^(ع)، تهران، ایران

^۲ مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه...^(ع)، تهران، ایران

چکیده

اهداف: در این مطالعه، اثر حفاظتی هگزامتیلن تترآمین (HMT) و N-استیل - سیستین (NAC) در مقابل سولفور موستارد (HD) در سلول‌های فیبروبلاست پوست انسانی رده HF2FF مقایسه شد.

مواد و روش‌ها: اثر HD (۱۸۰ μM) و اثر پیش‌درمانی یا درمان همزمان با HMT (۱۵ μM) و NAC (۰/۱ mM) بر مرگ سلولی و اندامک‌های سلولی با میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: HMT از بیش از ۳۸٪ و NAC از حدود ۳۳٪ مرگ سلولی ناشی از HD جلوگیری نمود. طبق مشاهدات میکروسکوپ الکترونی، HD سبب تخریب غشای سلول و اندامک‌ها (میتوکندری، لیزوزوم و غیره) و علائم نکروز سلولی شد. HMT سبب افزایش سلول‌های نرمال با لیزوزوم سالم شد، ولی شبکه آندوپلاسمی و گلژی نسبتاً واکنش‌ناپذیر شدند و بعضی میتوکندری‌ها کاملاً استروما را از دست دادند. در گروه NAC، میتوکندری‌ها متراکم شدند، سیتوپلاسم نرمال نبود و هسته علائم واکنش‌ناپذیر شدن داشت، ولی تخریب نسبت به کنترل کمتر بود و اندامک‌های سلولی نیز نظیر دستگاه گلژی و لیزوزوم سالم مانده بودند.

نتیجه‌گیری: HD بلافاصله پس از تماس اثرات مخرب را اعمال می‌کند و پیش‌درمانی موثرترین راه مقابله است. مصرف HMT یا NAC قویا از مرگ و نیز تغییرات اندامک‌های سلولی جلوگیری می‌نمایند. اثر محافظتی HMT در پیشگیری از مرگ سلولی ناشی از HD بیشتر از NAC است.

کلیدواژه‌ها: سولفور موستارد، سلول‌های فیبروبلاست رده HF2FF، هگزامتیلن تترآمین، N-استیل - سیستین

Comparison of protective effects of N-acetyl-cysteine and Hexamethylenetetramine on sulfur mustard induced pathological effects in human skin fibroblast cell line HF2FF using electron microscope

Saberi M.* *PhD*, Zare'ei Mahmudabadi A.¹ *PhD*, Pirzad Jahromi J.² *MSc*

*"Department of Pharmacology & Toxicology, Faculty of Medicine" & "Chemical Injuries Research Center",
Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

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

²Chemical Injuries Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Aims: In this study the protective effect of hexamethylenetetramine (HMT) and N-acetyl-cysteine (NAC) were compared against sulfur mustard (HD) on human skin fibroblast cells line HF2FF.

Materials & Methods: The effects of HD (180 μM) and simultaneous or pre treatment with HMT (15 μM) and NAC (0.1 mM) on cell death and cell organelles were investigated using electronic microscope.

Results: The HMT and NAC prevented cell death more than 50% and about 35%, respectively. EM observation revealed that HD caused destruction of cell membrane and organelles (mitochondria, lysosome, etc.) and cell necrosis signs. HMT caused an increase in normal cells with intact lysosomes, but the reticulum endoplasmic and Golgi bodies were partially vacuolated and the Struma of some mitochondria was lost. In NAC group mitochondria were concentrated. Cytoplasm was not normal and nuclear had some signs of vacuolization, but destruction was less than control and cell organelles such as Golgi bodies and lysosomes remained intact.

Conclusion: HD induces the destructive effects immediately after exposure and pretreatment is the most effective way. Application of either HMT or NAC strongly prevents the cell death and the organelles changes. The protective effect of HMT against the cell death is higher than NAC's.

Keywords: Sulfur Mustard, HF2FF Fibroblast Cell Line, Hexamethylene Tetramine, N-Acetyl-Cysteine (NAC)

مقدمه

لیزوزومها است که در نهایت منجر به مرگ سلولی می‌شود [۸]. نقش سیستم آنتی‌اکسیدانی سلول و از جمله گلوکاتایون، در احیاء گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و جلوگیری از پراکسیداسیون و از بین رفتن غشا سلولی حیاتی است [۴، ۶، ۷، ۸]. لذا سولفور موستارد دارای آثار عام و فراگیر بر چندین هدف مهم در بدن است که پیشگیری، محافظت و درمان سریع در برخورد با آن بسیار مهم است. بعضی ترکیبات جدید از جمله HMT (هگزامتیلن تترآمین) [۹، ۱۰] و NAC (N-Acetyl-S-cysteine) [۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴] می‌توانند از طریق خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد یا تقویت گلوکاتایون سلولی با رادیکال‌های آزاد ایجاد شده یا ترکیبات نوکلئوفیل از جمله یون سولفونیم واکنش داده و آن را خنثی نمایند. اثر این ترکیبات در بعضی رده‌های سلولی مشخص شده است [۹، ۱۰، ۱۳، ۱۴]، ولی در پوست انسان از جمله سلول‌های فیبروبلاست بررسی نشده است. به علت طبیعت کارسینوژن سولفور موستارد و نیز عوارض ماندگار و خطرناک این ماده، استفاده از داوطلبان انسانی برای مطالعه مقدر نبود، لیکن کشت سلول‌های پوست از جمله فیبروبلاست که در مواجهه با خردل نقش بسیار مهمی دارند، مدل بسیار مناسبی برای این بررسی است.

هدف از این مطالعه، بررسی اثرات پاتولوژیک خردل بر ارگان‌های سلولی در سلول‌های فیبروبلاست پوست انسانی رده HF2FF و نیز بررسی و مقایسه آثار محافظتی HMT و NAC بر عوارض پاتولوژیک سولفور موستارد با استفاده از میکروسکوپ الکترونی بود.

مواد و روش‌ها

کشت سلولی

رده سلولی HF2FF (C190؛ انستیتو پاستور؛ ایران) در محیط کشت RPMI (Biochrom AM؛ آلمان) شامل ۱۰٪ FCS، پنی‌سیلین و استرپتومایسین هر کدام ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر و بی‌کربنات سدیم به میزان ۲ گرم بر لیتر، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO₂، ۹۵٪ هوای مرطوب، در فلاکس‌های ۵۰ ml کشت داده شدند. این سلول‌ها پس از رشد در فاز لگاریتمی با تریپسین جدا شده و در ۸۰ درجه سانتی‌گراد و DMSO ذخیره شدند تا در آزمایشات مورد استفاده قرار گیرند.

بررسی بقای سلول‌های آلوده به خردل به روش کریستال ویوله

بر اساس مطالعات قبلی [۶، ۱۰] غلظت اپتیمم خردل، ۱۸۰ μM انتخاب شد. خردل در محیط کشت، تهیه و به سلول‌های نرمال و القاشده در حضور گروه کنترل افزوده شد. پس از یک ساعت مجاورت، محیط کشت تخلیه شده و پس از شستشو، محیط تازه افزوده و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. سپس میزان بقای آنها به این روش، مورد بررسی قرار گرفت [۹، ۱۴] که پس از حذف محیط کشت، ابتدا سلول‌ها با HBSS (Biomedical Inc؛ انگلستان) شست‌و شو داده شده و سپس با فرم‌آلدئید (۴٪ V/V) در PBS به مدت ۲۰ دقیقه و در

سولفور موستارد (۲ و ۲ دی‌کلرو دی‌اتیل سولفید، HD) که به نام گاز خردل نیز معروف است، عامل آلکیل‌کننده‌ای است که به‌عنوان موثرترین سلاح شیمیایی ضمن جنگ جهانی اول معرفی شد و بیش از ۱ میلیون و ۲۰۰ هزار سرباز طی جنگ، در معرض این گاز قرار گرفتند که حدود ۴۰۰ هزار نفر از آنها نیاز به درمان‌های طولانی‌مدت داشتند [۱]. موج جدید استفاده از گاز خردل در جنگ تحمیلی عراق علیه ایران (سال ۱۹۸۸-۱۹۸۰) بود که حدود ۴۵۰۰ مصدوم برجای گذاشت [۲]. HD پس از تماس با آب، ابتدا به یک ترکیب حلقوی به نام اتیلن سولفونیم با بار مثبت روی گوگرد تبدیل می‌شود که به‌علت الکتروفیل بودن با مراکز نوکلئوفیل اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها واکنش داده و عمل طبیعی این ماکرومولکول‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد. سمیت خردل با دو بازوی فعال، بیشتر از سمیت خردل گوگردی با تک بازوی فعال است (سمی-موستارد)، چون قادر است با دو نیتروژن در موقعیت ۷-گوانین به دو نقطه از یک زنجیره یا دو رشته DNA متصل شده و موجب کراس-لینک بین دو زنجیره و داخل زنجیره DNA و در نتیجه مهار سنتز DNA، RNA و پروتئین شود که نقش مهمی در عوارض دیررس عامل دارد [۱، ۳]. در غلظت‌های بالاتر، مکانیزم‌های دیگری به‌جز کراس-لینک در DNA اهمیت دارند و مرگ سریع‌تر سلولی را القا می‌کنند. تخریب حاد قرینه، غشاء مخاطی و پوست با HD احتمالاً با واسطه سایر مکانیزم‌ها ایجاد می‌شود [۴].

یکی از مکانیزم‌های احتمالی در تخریب حاد، تخلیه NAD⁺ (نیکوتین آمید آدنین دی‌نوکلئوتید) است. آلکیلاسیون رشته DNA توسط خردل موجب شکست در زنجیره DNA می‌شود. برای ترمیم DNA، آنزیم‌های ترمیم‌کننده از جمله پلی‌آدنوزین دی‌فسفات و ریبولی‌مراز (PADPRP) با فعالیت زیاد به‌طور موثر موجب تخلیه NAD⁺ سلولی (سوبسترای مهم مسیر گلیکولیز) و در نتیجه مهار گلیکولیز، افزایش گلوکز-۶-فسفات و مسیر پنتوز فسفات می‌شوند. این مسیر موجب فعال شدن پروتازهای سلولی شده که نهایتاً منجر به نکروز سلولی و نیز تشکیل تاول می‌شود [۱، ۵].

مکانیزم بالقوه دیگر مرگ سلولی، غیرفعال شدن سریع پروتئین‌های حاوی سولفیدریل و پلی‌پپتیدها، نظیر گلوکاتایون است. ترکیبات سولفیدریل برای حفظ ویژگی‌های اکسیداسیون-احیای اجزای سلولی ضروری است [۶]. خردل گوگردی مشابه مواد اکسیدکننده موجب افزایش آنیون سوپراکسید (O₂⁻) و هیدروژن پراکسید شده که در غلظت‌های بالا می‌تواند با سوپراکسید یا آهن واکنش داده و رادیکال هیدروکسیل (OH) شدیداً فعال تولید کند [۷]. مجموع O₂⁻، H₂O₂ و OH. را گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌گویند که باعث تخلیه سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی و در نتیجه غیرفعال شدن سریع پروتئین و عدم حفاظت بدن می‌شود. بنابراین یک سری فرآیندهای کاتابولیکی وابسته به Ca²⁺ در داخل سلول فعال می‌شود. از آن جمله، افزایش فعالیت پروتازها، اندونوکلازاها و فسفولیپازها و تخریب غشای

مقایسه آثار محافظتی هگزامتیلن تتر آمین و N-استیل-سیستئین بر عوارض پاتولوژیک سولفور موستارد ۳
HBSS+NAC به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در پلیت‌های ۹۶ حفره و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول HBSS+HD مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌ها به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده، سپس محیط آنها با ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت تازه، جایگزین و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و میزان سلول‌های زنده پس از زمان فوق با روش‌های GV و NR تعیین شد. سلول‌های HF2FF با HBSS به تنهایی، HBSS+NAC، HBSS+HD، HD+HBSS+NAC (۲۴ حفره برای هر گروه) مجاور شدند. غلظت نهایی NAC، ۰/۱ میلی‌مولار و حداکثر زمان در این آزمایش‌ها ۲۴ ساعت انتخاب شد.

تهیه نمونه برای مشاهده با میکروسکوپ الکترونی

سلول‌های مربوط به گروه‌های کنترل، دریافت کننده HD یا HD+NAC، HD+HMT، HD+HMT طی مراحل ذیل آماده و برای مشاهده با میکروسکوپ الکترونی برش زده شدند: ابتدا سلول‌ها توسط محلول گلو تار آلدئید ۵-۲٪ به مدت ۲ ساعت فیکس شده، پس از شستشو با بافر فسفات ۰/۱ مولار مجدداً با اسمیوم تتراسید ۱٪ به مدت ۲ ساعت زیر هود فیکس شدند. پس از شستشوی مجدد با بافر فسفات ۰/۱ مولار، آب‌گیری با استون ۱۰۰-۵۰٪ هر ۳۰ دقیقه و طی ۶ مرحله انجام گرفت. سپس اینفیلتراسیون با استون و رزین طی ۴ مرحله و فروربردن در رزین به مدت ۲۴ ساعت در ۷۰ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت و در نهایت سلول‌ها برش داده شدند.

یافته‌های کمی حاصل، بر حسب میانگین و انحراف استاندارد گزارش شد. مقایسه آماری با استفاده از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه انجام شد.

نتایج

اثر HD بر سلول‌های HF2FF

HD با غلظت LC50 معادل ۱۸۰ میکرومولار سبب کاهش بسیار معنی‌دار ($p < 0.001$) در میزان سلول‌های زنده شد و پس از ۶۰ دقیقه بیش از ۵۸-۵۵٪ سلول‌ها از بین رفتند (نمودار ۱).

اثر محافظتی HMT در مقابل اثرات HD بر سلول‌های HF2FF
HMT به تنهایی، در غلظت ۱۵ میلی‌مولار هیچ‌گونه اثر معنی‌داری بر میزان سلول‌های زنده نداشت. سلول‌های HF2FF، ابتدا HMT را با غلظت نهایی ۱۵ میلی‌مولار دریافت نموده و سپس در معرض خردل قرار گرفتند. با روش اندازه‌گیری NR، میزان سلول‌های زنده از ۵۰/۳٪ (در حضور HD به تنهایی) تا ۸۸/۶٪ (PreHMT+HD) افزایش نشان داد که از نظر آماری بسیار معنی‌دار ($p < 0.001$) بود (نمودار ۱). مصرف همزمان HD و HMT در محیط کشت سلول‌های HF2FF نشان داد که HMT می‌تواند در مقایسه با HD به تنهایی، میزان سلول‌های زنده را ۲۳٪ با روش سنجش NR افزایش دهد ($p < 0.001$)، نمودار ۱).

۲۰°C فیکس شدند. سپس، بعد از خارج کردن محلول فیکس کننده، سلول‌ها با کریستال ویوله (۱/۱٪ W/V) به مدت ۳۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شده و با آب شستشو داده شدند. به منظور حل کردن رنگ متصل به سلول از تریتون ۱۰۰-X (۲٪ V/V) استفاده شد و پس از یک ساعت انکوباسیون و ۵ دقیقه تکان دادن، جذب رنگ محلول در مقابل محلول بلانک در ۵۹۰nm اندازه‌گیری شد.

رنگ‌آمیزی سلول‌ها با قرمز خشتی (NR)

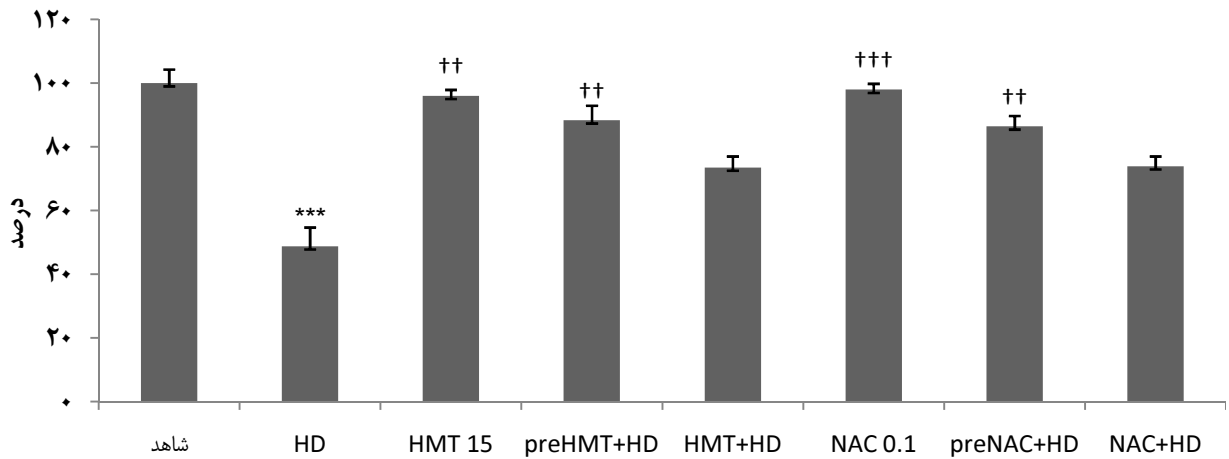
برای تعیین بقای سلول‌ها از رنگ‌آمیزی NR استفاده شد. ابتدا محیط کشت موجود روی سلول‌ها خالی شده و سپس به تمام حفرات پلیت ۹۶ تایی، حجم ۲۰۰ میکرولیتر NR (۵٪ W/V) در محلول HBSS اضافه شد و سلول‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سلول‌ها دوبار با فرم‌آلدئید (۴٪ W/V) در بافر فسفات شسته شدند. سپس اسید استیک (۱٪ V/V) و اتانول (۵۰٪ V/V) هر کدام به حجم ۱۰۰ میکرولیتر به پلیت‌ها اضافه شده و پلیت‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در مجاورت این محلول‌ها برای حل شدن رنگ‌های باقی‌مانده نگهداری شدند. سپس جذب نوری پلیت‌ها با فیلتر ۵۴۰ نانومتر در دستگاه پلیت ریدر (Multiskan Multisoft؛ فنلاند) خوانده شد.

اثر محافظتی HMT بر سلول‌های HF2FF آلوده به خردل

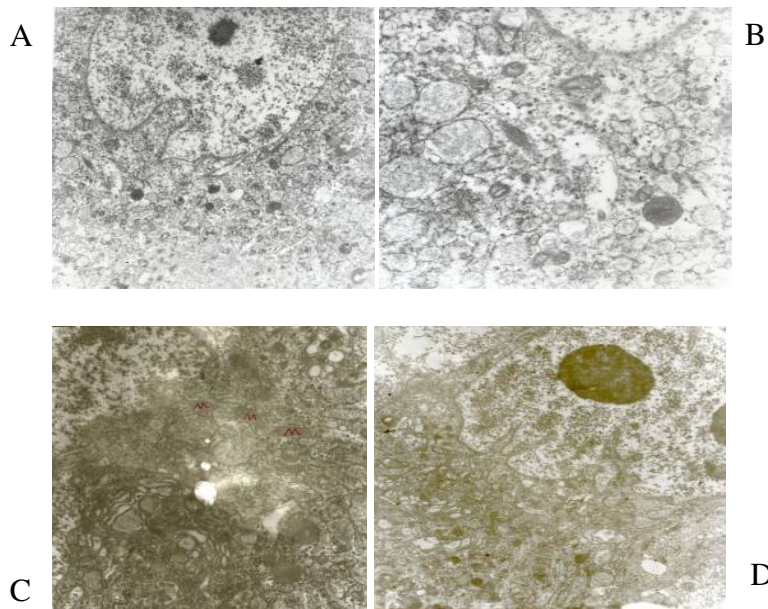
بر اساس مطالعات قبلی، غلظت ۱۵ میلی‌مولار HMT (Sigma؛ انگلستان) با بقای ۹۸٪ انتخاب شد [۱۰]. برای بررسی میزان توانایی HMT در مقابله با اثرات HD (سازمان صنایع دفاع؛ ایران) و محافظت سلول‌ها در مقابل LC50 (غلظت کشنده ۵۰٪) از HD، محلول ۳۰ میلی‌مولار HBSS+HMT به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به پلیت‌های ۹۶ حفره (۲۴ حفره برای هر گروه) افزوده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول HBSS+HD بعد از افزودن HMT به آن اضافه شد. سلول‌ها به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده، سپس محلول‌ها با ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت، جایگزین و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و میزان سلول‌های زنده پس از زمان فوق با روش‌های GV و NR تعیین شد. سلول‌های HF2FF با HBSS به تنهایی، HBSS+HMT، HBSS+HD، HD+HBSS+HMT (۲۴ حفره برای هر گروه) مجاور شدند. غلظت نهایی HMT به تنهایی ۱۵ میلی‌مولار و HD ۱۸۰ میکرومولار تنظیم شد. با توجه به گزارش‌های قبلی مبنی بر این که حتی غلظت‌های زیاد خردل (۱۰۰۰ میکرومولار) پس از ۲۴ ساعت، اثر کاهنده بیشتری بر میزان سلول‌های زنده ندارد، لذا حداکثر زمان در این آزمایش‌ها ۲۴ ساعت انتخاب شد.

اثر محافظتی NAC بر سلول‌های HF2FF در معرض خردل

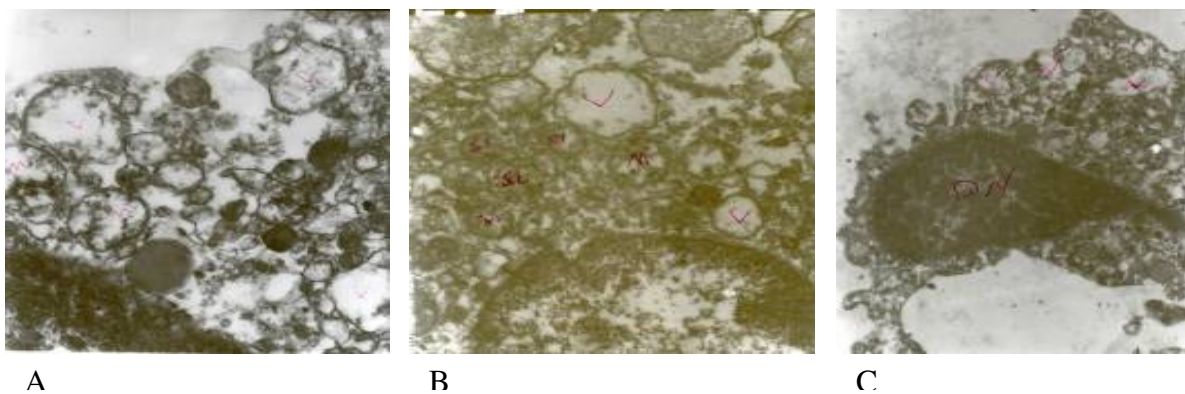
با توجه به افزایش بقای سلولی به بالای ۹۵٪ در حضور غلظت ۰/۱ میلی‌مولار NAC [۶]، این غلظت برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شد. توانایی NAC در مقابله با اثرات HD برای محافظت سلول‌ها در مقابل LC50 از HD با افزودن محلول ۰/۱ میلی‌مولار



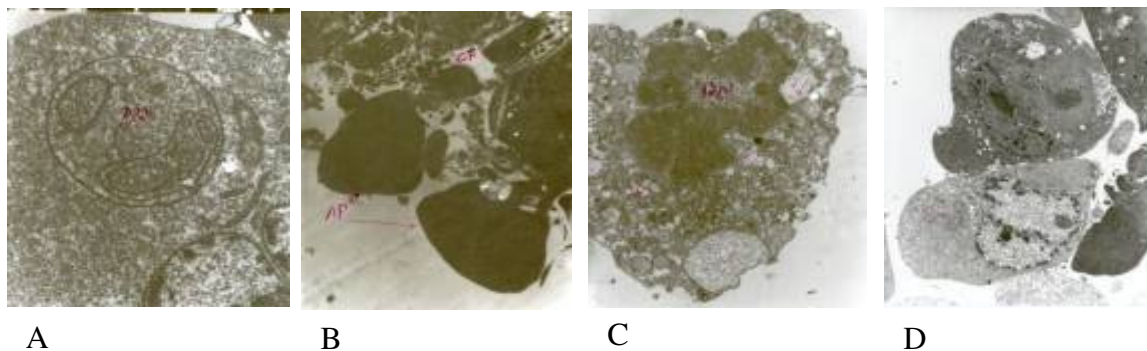
نمودار ۱ اثر محافظتی HMT و NAC در پیشگیری از مرگ سلولی ناشی از HD. میزان سلول‌های زنده با استفاده از رنگ‌آمیزی NR تعیین شده‌اند. HMT و NAC به‌تنهایی، قبل (PreHMT+HD) یا همزمان (HMT+HD). * نسبت به گروه کنترل و † نسبت به HD معنی‌دار است. داده‌ها برحسب درصد کنترل بیان شده‌اند. تعداد نمونه در هر گروه حداقل ۲۴ است. †† پیمانگر $p < 0.01$ و ††† یا *** $p < 0.001$.



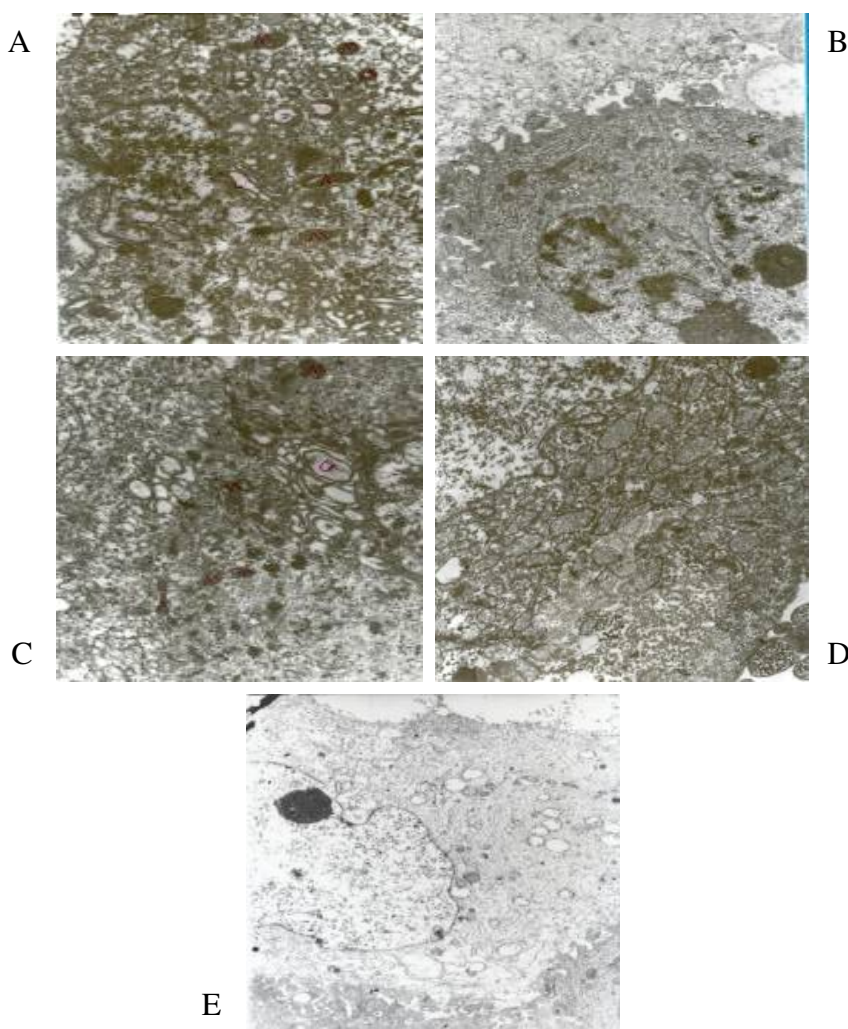
شکل ۱ نمای برش سلولی فیبروبلاست رده HF2FF و مشاهده با میکروسکوپ الکترونی. گروه کنترل: (A) هسته با غشاء سالم و هستک‌ها، بزرگنمایی ۷۰۰۰ (B) میتوکندری، شبکه آندوپلاسمی و لیزوزوم‌ها با بزرگنمایی ۲۰۰۰۰ (C) دستگاه گلژی و میتوکندری‌ها کاملاً مشهودند. با بزرگنمایی ۱۲۰۰۰ (D) غشای هسته و شبکه آندوپلاسمی کاملاً سالم است.



شکل ۲ گروه دریافت‌کننده HD (۱۸۰ μM) در مقایسه با گروه کنترل: (A) سلول‌ها کاملاً تخریب شده‌اند به‌طوری که پارگی غشاء سلول، تیره‌شدن هسته و تخریب ارگانل‌ها کاملاً مشهود است. (B) واکوئوله‌شدن ارگانل‌ها و تخریب میتوکندری‌ها و (C) علایم نکروز سلولی مشهود است.



شکل ۳) گروه دریافت‌کننده HD (۱۸۰ μM). تغییرات شامل (A) جمع شدن سلول، تلاشی و تخریب ارگانل‌ها (B) دوبله شدن هسته، اتوفاژی (C) سلول‌های متراکم و در حال تکه‌تکه شدن مشهود است. (D) تغییرات هسته با غشاء چین‌خورده و در حال تخریب همراه با سیتوپلاسم تخریب‌شده نیز مشاهده می‌شود.



شکل ۴) پیش‌درمانی با HMT (۱۵Mm) قبل از تماس با HD (۱۸۰ μM) انجام شده است: (A) ضمن وجود سلول‌های نرمال (B) بعضی سلول‌ها دارای تراکم میتوکندری (C) شبکه آندوپلاسمیک و دستگاه گلژی واکوله شده (D) همراه با متورم شدن شبکه آندوپلاسمیک هستند. (E) بعضی میتوکندری‌ها کاملاً استروما را از دست داده‌اند.

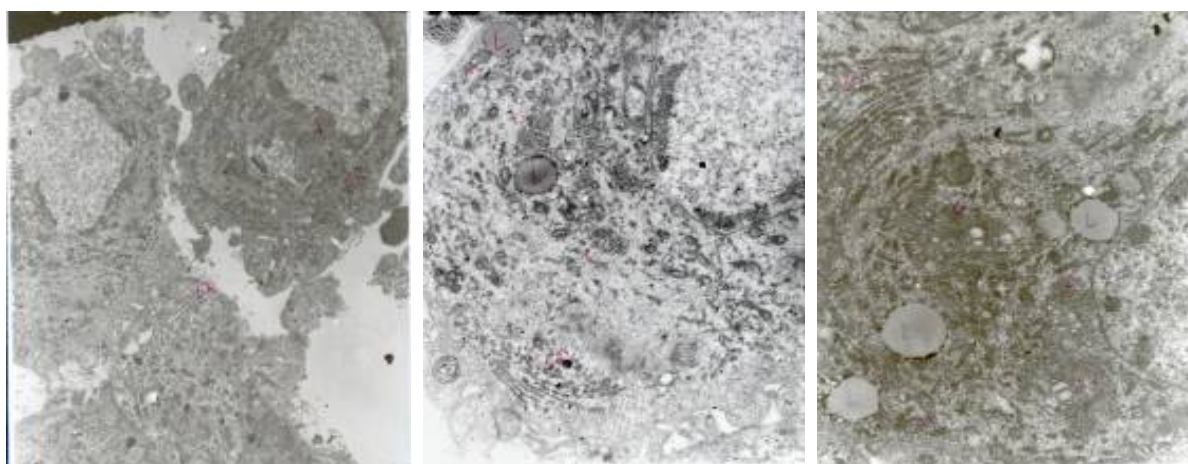
اثر NAC بر سمیت HD

در مطالعات قبلی، NAC به‌تنهایی در غلظت‌های بالاتر از ۰/۵ میکرومولار میزان سلول‌های زنده را کاهش داده است [۱۱]، لذا به‌منظور مقابله با اثرات HD، از دوز ۰/۱ میکرومولار استفاده شد.

هرچند هر دو روش مصرف HMT قبل یا همزمان با HD، اثر محافظتی برجسته‌ای بر سلول‌های HF2FF داشت، لیکن مصرف HMT قبل از HD اثر محافظتی بیشتری (۳۸٪ در مقابل ۲۳٪) بر سلول‌های فوق ایجاد نمود.

مصرف همزمان NAC و HD نیز افزایش معنی‌دار ($p < 0.01$) ولی کمتری (۲۳/۵٪) در تعداد سلول‌های زنده ایجاد نمود (نمودار ۱).

پیش‌درمانی با NAC به‌طور بسیار معنی‌داری ($p < 0.001$) میزان سلول‌های زنده را نسبت به گروه دریافت‌کننده HD به‌تنهایی تا ۲۳/۵٪ افزایش داد (نمودار ۱).

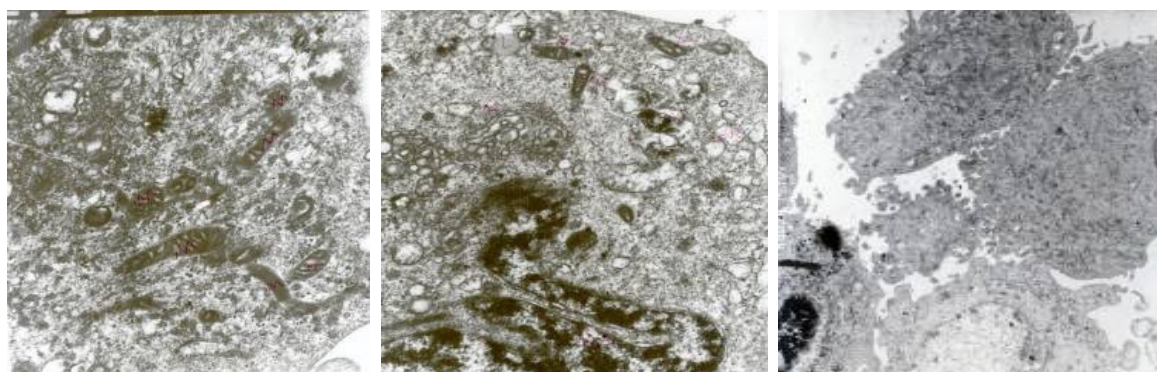


A

B

C

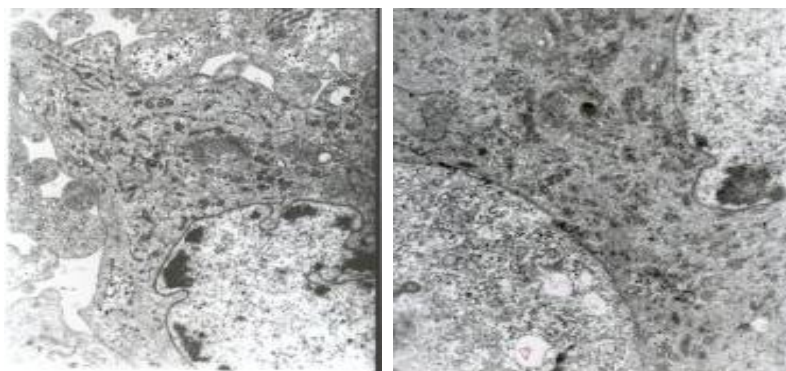
شکل ۵ درمان همزمان با HMT (۱۵ mM) و HD (۱۸۰ μM) انجام شده است: (A) سلول‌های نسبتاً سالم در کنار یکدیگر (B) شبکه آندوپلاسمی و میتوکندری با تغییرات کمی با هسته متراکم (C) منظره‌ای از یک سلول سالم با میتوکندری و شبکه آندوپلاسمی همراه با واکوئل‌های بیشتر مشهود است.



A

B

C



D

E

شکل ۶ گروه پیش‌درمان شده با NAC (۱ mM) و سپس HD (۱۸۰ μM): (A) میتوکندری‌ها کاملاً متراکم و سیتوپلاسم نرمال نبوده و علائم واکوئل‌شدن را دارد. (B) گروه درمان همزمان با NAC: هسته کاملاً واکوئل شده و واکوئل‌های کوچک به تعداد زیاد پراکنده‌اند. (C) گروه پیش‌درمان شده: مجموعه‌ای از سلول‌های سالم را می‌توان کنار هم مشاهده کرد. (D) در گروه پیش‌درمان شده ارگان‌های سلولی نیز نظیر دستگاه گلژی سالم مانده‌اند. (E) علائم تخریب در بعضی سلول‌ها مشاهده می‌شود.

مشاهدات با میکروسکوپ الکترونی

مطالعات میکروسکوپی نشان داد که سلول‌ها پس از آلودگی با HD کاملاً از یکدیگر جدا، چروکیده و نکروز شده‌اند. نمونه‌های برش خورده سلول‌های فیبروبلاست رده HF2FF با میکروسکوپ الکترونی مشاهده و تصاویر مربوطه تهیه شد. در گروه کنترل، هسته با غشای سالم و هستک‌ها مشاهده شده (شکل ۱A) و ارگانل‌های سلولی نظیر میتوکندری، شبکه آندوپلاسمی و لیزوزوم‌ها با بزرگنمایی ۲۰۰۰۰ (شکل ۱B) و نیز دستگاه گلژی و میتوکندری‌ها با بزرگنمایی ۱۲۰۰۰ کاملاً مشهود بودند (شکل ۱C). در ضمن، غشای هسته و شبکه آندوپلاسمی کاملاً سالم بود (شکل ۱D). در گروه دریافت‌کننده HD با غلظت $180 \mu\text{M}$ در مقایسه با گروه کنترل، سلول‌ها کاملاً تخریب شده بودند، به طوری که پارگی غشای سلول، تیره شدن هسته و تخریب ارگان‌ها به وضوح مشاهده شد (شکل ۲A). همچنین واکوئول‌شدن ارگانل‌ها و تخریب میتوکندری‌ها (شکل ۲B) و علایم نکروز سلولی نیز مشهود بود (شکل ۲C). در گروه دریافت‌کننده HD تجمع سلول‌ها و تخریب ارگانل‌های سلولی (شکل ۳A)، دوبله شدن هسته، اتوفازی (شکل ۳B) و سلول‌های متراکم و در حال تکه تکه شدن (شکل ۳C)، همچنین تغییرات هسته با غشاء چین خورده و در حال تخریب همراه با سیتوپلاسم تخریب شده مشهود بود (شکل ۳D).

در گروهی که پیش‌درمانی با HMT انجام شده بود، ضمن وجود سلول‌های نرمال (شکل ۴A) بعضی سلول‌ها دارای تراکم میتوکندری (شکل ۴B) و شبکه آندوپلاسمیک و گلژی واکوئوله شده (شکل ۴C) همراه با شبکه آندوپلاسمیک متورم بودند (شکل ۴D). بعضی میتوکندری‌ها کاملاً استروما را از دست داده بودند (شکل ۴E). لیکن در درمان HMT همزمان با آلودگی، سلول‌های سالم، کمتر (شکل ۵A) و بعضی تغییرات نسبت به درمان قبل از تماس با HD بیشتر مشهود بود، به طوری که شبکه آندوپلاسمی و میتوکندری با کمی تغییرات و هسته متراکم در اشکال C و B دیده می‌شوند.

در گروه پیش‌درمان شده با NAC و سپس HD، میتوکندری‌ها کاملاً متراکم، لیکن سیتوپلاسم غیرطبیعی و هسته علایم واکوئوله شدن را داشت (شکل ۶A). ولی تخریب سلولی نسبت به سلول‌های درمان نشده کمتر بود. شکل ۶C مجموعه‌ای از سلول‌های سالم را کنار هم نشان می‌دهد. ارگانل‌های سلولی نیز نظیر دستگاه گلژی سالم مانده (شکل ۶D) و علایم تخریب در بعضی سلول‌ها مشاهده شد (شکل ۶E).

بحث

بروز سریع اثرات HD نشان داده که این ماده یکی از سموم بسیار سریع‌الاثرا بوده و به‌ویژه در دوزهای بالاتر از $30 \mu\text{M}$ میکرومولار ظرف مدت زمان کمتر از ۵ دقیقه اثرات مخرب و کشنده‌ای بر سلول‌ها ایجاد می‌کند [۱۰]. این اثر کاملاً وابسته به غلظت بوده و با آن نسبت مستقیم دارد. با توجه به ثابت شدن نسبی اثر HD در زمان‌های ۶۰-

۱۵ دقیقه و گزارشات قبلی در این خصوص [۶، ۱۰، ۱۴]، میزان سلول‌های زنده تا یک ساعت پس از آلودگی با غلظت $180 \mu\text{M}$ میکرومولار HD، تعیین و برای ارزیابی کارایی و اثرات محافظتی داروها به کار گرفته شد. در این مطالعه HD سبب حدود ۵۰٪ مرگ سلولی شده است.

به نظر می‌رسد، تغییرات مورفولوژیک سریع سلول‌های HF2FF در برابر HD شامل چروکیده شدن و جدایی از یکدیگر، به علاوه توانایی احتباس رنگ NR، احتمالاً باعث به وجود آمدن آپوپتوزیس می‌شود که متعاقب شکسته شدن غشای سلول رخ خواهد داد. این پدیده با توجه به تغییرات مشاهده شده در تصاویر میکروسکوپ الکترونی نظیر چروکیدگی و جمع شدن غشای سلولی و هسته و شکسته شدن لیزوزوم‌ها حایز اهمیت است. لیکن مرگ سلولی ناگهانی و سریع تعداد زیادی از سلول‌ها پس از ۵ دقیقه و متناسب با غلظت می‌تواند بیشتر دال بر نکروز سلولی باشد [۱، ۹، ۱۵]. هرچند اتصال HD به DNA و شکسته شدن DNA سبب فعال شدن آنزیم پلی-ADP-ریبوزیل پلی-مراس و در نتیجه کاهش ATP ، NAD^+ و شکسته شدن آنها و سرانجام افزایش رادیکال آزاد اکسیژن و مرگ سلول می‌شود، لیکن مکانیزم سریع مرگ سلولی شاید بیشتر به کاهش GSH و آلکیلاسیون تیول پروتئین‌ها ارتباط داشته باشد [۱۴، ۱۶، ۱۷]. به دنبال 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 می‌شود [۱، ۱۷، ۱۸]. مطالعات متعددی اثرات محافظتی HMT را در مدل‌های سلولی مختلف نشان داده‌اند. HMT به همراه گلوکوتایون احیاء سبب محافظت سلول‌های SCK14 (رده سلولی کراتینوسیت انسانی) تا ۷۲ ساعت در مقابل غلظت $10 \mu\text{M}$ میکرومولار HD شده است. همچنین سلول‌های عمقی ریه شامل رده سلولی A549 تحت اثرات محافظتی HMT، در مقابل اثرات مخرب HD مقاومت کرده و تعداد سلول‌های زنده پس از ۴۸ ساعت بیش از ۹۰٪ افزایش نشان داده‌اند [۹]. با توجه به این که در مطالعات قبلی، کاربرد HMT قبل از آلودگی با HD اثرات محافظتی بیشتری داشته و پس از آلودگی بی‌تاثیر بوده است [۱۰]، لذا داروها قبل از آلودگی با HD به محیط اضافه شدند و در نتیجه، کاربرد HMT قبل یا همزمان با HD، میزان سلول‌های زنده را افزایش داده است.

افزایش غلظت HMT به بیش از ۲۵ میلی‌مولار اثرات محافظتی بیشتری از خود نشان نداده است که دال بر اثر محدود HMT است [۱۰]. همچنین خارج نمودن HMT از محیط کشت قبل از آلودگی با HD، اثر محافظتی ایجاد ننموده است [۹]. لذا احتمالاً HMT موجود در هنگام آلودگی با HD، به عنوان نوکلئوفیل قوی عمل کرده و با یون سولفونیوم ایجاد شده توسط HD سریعاً و قبل از واکنش با عناصر سلولی، واکنش داده و آن را بی‌اثر می‌نماید. شاید به همین دلیل برای اثربخشی مناسب، HMT باید قبل از HD در محیط وجود داشته

ارگانل‌ها بیشتر دال بر نکرور سلولی هستند. از طرفی، بعضی از سلول‌ها حالت چروکیده و جمع‌شده پیدا کردند و هسته دولبه سلول با غشای چین‌خورده همراه با اتوفازی، شاید دلیلی بر پدیده آپوپتوزیس باشد. در غلظت‌های زیاد HD شاید سلول‌ها با نکرور شدن دچار مرگ شده‌اند و در غلظت‌های کمتر احتمالاً مرگ سلول ناشی از پدیده آپوپتوزیس است. سلول‌هایی که قبل از تماس با HD توسط HMT یا NAC پیش‌درمانی شده بودند، دچار تورم در شبکه آندوپلاسمیک و تراکم میتوکندری شده، ولی اکثر سلول‌ها ظاهری سالم داشته‌اند. از طرفی درمان همزمان HMT و آلودگی با HD در مشاهدات EM محافظت بیشتری را نشان داده و سلول‌های نسبتاً سالم همراه با ارگانل‌های مشخص و تغییرنیافته مشهود بودند. البته تغییرات مختصری در میتوکندری و شبکه آندوپلاسمی نمایان بود. در مشاهدات EM، HMT اثر محافظتی بیشتری نسبت به NAC از خود نشان داده بود. سلول‌های از پیش درمان شده با NAC، واکنش داده و تخریب در بعضی از سلول‌ها نیز وجود داشته است. لکن در سلول‌هایی که درمان همزمان انجام شده دستگاه گلژی سالم مانده است. این مشاهدات بیانگر این واقعیت است که در تقابل با آلودگی ناشی از HD باید سریع و در زمان مناسب، قبل از تماس HD یا بلافاصله همزمان با بروز آلودگی، آنتی‌دوت یا شلاتور مناسب در محیط موجود باشد تا بتواند با آثار مستقیم و غیرمستقیم این ماده مقابله نماید. HMT می‌تواند به‌عنوان یک نوکلئوفیل بسیار قوی عمل نموده که توان خنثی‌نمودن فرم آزاد یا یون سولفونیوم مشتق‌شده از HD را دارد و شاید بدین دلیل از NAC کارایی بیشتری نشان داده است.

نتیجه‌گیری

HD، بلافاصله پس از تماس، اثرات مخرب خود را اعمال می‌کند. در نتیجه پیش‌درمانی مؤثرترین راه مقابله است. مصرف HMT یا NAC قویاً از مرگ و نیز تغییرات ارگانل‌های سلولی جلوگیری می‌نماید. اثر محافظتی HMT در پیشگیری از مرگ سلولی ناشی از HD بیشتر از NAC است.

منابع

- 1- Papirmeister B, Feister AJ, Robinson SI, Ford RD. Medical defence against mustard gas: Toxic mechanisms and pharmacological implications. New York: CRC Press; 2000.
- 2- Ghanei M, Aslani J, Khateri S, Hamadanizadeh K. Public health status of the civil population of Sardasht 15 years following large-scale wartime exposure to sulfur mustard. J Burns Wounds. 2003;2:7-9.
- 3- Naghii MR. Sulfur mustard intoxication, oxidative stress and antioxidants. Mil Med. 2002;167:573-5.
- 4- Dale AD, Henry JF. Glutathione in defense and signaling. Ann N Y Acad Sci. 2002;973:488-504.
- 5- Kehe K, Balszuweit F, Steinritz D, Thiermann H. Molecular toxicology of sulfur mustard induced cutaneous inflammation and blistering. Toxicol. 2009;263:12-9.
- 6- Zaree Mahmoudabad AB, Saberi M, Pirzad J. Critical role

باشد. از طرفی، مطالعه با سلول‌های لنفوسیت خون انسانی نشان داد که سیستئین اثر محافظتی کمتری در برابر HD ایجاد می‌کند [۱۹]. 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 [۲۰، ۲۱]. NAC نه تنها به عنوان برداشت‌کننده بلکه به‌عنوان پیش‌ساز گلوپروتئین و همچنین به‌عنوان احیاکننده GSSG نیز عمل می‌کند [۲۲].

با توجه به بروز بسیار سریع واکنش HD با عناصر سلولی، بهترین روش برای مقابله با آن به‌کارگیری مواد محافظ در برابر HD از جمله فرمولاسیون‌های رفع آلودگی نظیر کلرامید S-330 است که در محیط‌های قطبی یا غیرقطبی (روغنی) نیز بلافاصله آن را خنثی می‌نماید [۲۳]. لیکن پیشگیری از آلودگی، از راه‌های تنفس یا چشم بسیار مشکل است. NAC به‌منظور کاهش ایجاد عوارض، به‌عنوان تقویت‌کننده سیستم آنتی‌اکسیدان مورد استفاده قرار گرفت.

از آن‌جا که GSH نقش حیاتی در سم‌زدایی الکتروفیل‌ها و عوامل استرس اکسیداتیو بازی می‌کند [۱۵، ۲۴]، لذا استراتژی‌های مختلفی به‌منظور حفظ یا افزایش میزان GSH مورد توجه قرار گرفته است که از آن جمله تامین L-Cys به‌عنوان سوبسترا برای سنتز GSH است. L-Cys به‌طور خودبه‌خود به L-سیستئین نامحلول، اکسید می‌شود و گزارشات مکرر مبنی بر سمی بودن آن برای سلول‌های کشت داده‌شده ارایه شده است [۴]. بنابراین در بیشتر مطالعات از NAC هم به روش خوراکی و هم در محیط کشت، به‌عنوان ترکیبی که به‌راحتی در داخل سلول، داستیله شده و L-Cys تولید می‌کند، استفاده کرده‌اند. در مطالعه حاضر به‌منظور القاء GSH، غلظت ۰/۱ میلی‌مولار NAC، به‌عنوان سوبسترا در محیط کشت مورد استفاده قرار گرفت. البته مطالعات قبلی نشان داده‌اند که در غلظت‌های بالاتر NAC، افزایش در میزان GSH مشاهده نشده که احتمالاً ناشی از محدودیت در جذب NAC به داخل سلول است [۲۲]. پیش‌درمانی با NAC نسبت به درمان همزمان، کارایی بیشتری نشان داد (نظیر HMT). این تفاوت نشان می‌دهد که واکنش HD با عناصر سلولی بسیار سریع بروز نموده و این حقیقت را مشخص می‌کند که باید تا حد ممکن برای محافظت در مقابل مسمومیت خردل سریع عمل کرد. در این مطالعه، NAC حدود ۵٪ کمتر از HMT سبب پیشگیری از مرگ سلولی شده و اثرات مشابهی با مطالعات قبلی [۹، ۱۰] نشان داده است. همچنین HMT در مقایسه با N-استیل-سیستئین در مقابله با HD کارایی بیشتری داشته است.

در مطالعه حاضر تصاویر تهیه‌شده از میکروسکوپ الکترونی نشان دهنده وسعت ضایعات سلولی ناشی از تماس با HD و نیز تاییدکننده اثر محافظتی HMT و NAC بر سلول‌های فیبروبلاست رده HF2FF است. پارگی غشای سلولی ناشی از تماس با HD و تخریب

- protects A549 cells from the cytotoxic effects of sulphur mustard. *Human Exp Toxicol.* 1998;17:606-12.
- 16- Simpson R, Lindsay CD. Effect of sulphur mustard on human skin cell lines with differential agent sensitivity. *J Appl Toxicol.* 2005;25:115-28.
- 17- Biroccio A, Benassi B, Filomeni G, Amodei S, Marchini S, Chiorino G, et al. Glutathione influences c-Myc-induced apoptosis in M14 human melanoma cells. *J Biol Chem.* 2002;277:43763-70.
- 18- Zong WX, Ditsworth D, Bauer DE, Wang ZQ, Thompson CB. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes Dev.* 2004;18:1272-82.
- 19- Vijayaraghavan R, Kulkarni A, Pant SC. Differential toxicity of sulfur mustard administered through percutaneous, subcutaneous and oral routes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;202:180-8.
- 20- Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: Its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide and hypochlorous acid. *Biol Med.* 1989;6:593-7.
- 21- Smith CN, Lindsay CD, Rice P. The use of full thickness explanted human skin to model sulfur mustard induced skin injury. *Human Exp Toxicol.* 1996;15:164-9.
- 22- Cotgreave IA. N-acetylcysteine, pharmacological considerations and experimental and clinical applications. *Adv Pharmacol.* 1997;38:205-27.
- 23- Shih ML, Korte WD, Smith GR, Szafraniec LL. Reactions of sulfides with S-330: A potential decontaminant of sulfur mustard in formulations. *J Appl Toxicol.* 1999;1:83-8.
- 24- Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem.* 2005;52:711-60.
- of GSH in sulfur mustard-induced cytotoxicity in human skin fibroblast cell line. *Iranian J Pharmaceut Res.* 2008;7:35-41.
- 7- Paromov V, Suntres Z, Smith M, Stone WL. Sulfur mustard toxicity following dermal exposure: Role of oxidative stress and antioxidant therapy. *J Burns Wounds.* 2007;7:7-10.
- 8- Eklow L, Moldeus P, Orrenius S. Oxidation of glutathione during hydroperoxide metabolism: A study using isolated hepatocytes and glutathione reductase inhibitor 1,3-bis(2-chloroethyl)-nitrourea. *Euro J Biochem.* 2004;138:459-63.
- 9- 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.
- 10- Saberi M, Zaree A, Pirzad G, Golmanesh L, Imani H, Pourheidarizadeh G, et al. Assessment of the protective effect of hexamethylene tetramine on HF2FF cell line exposed to sulfur mustard. *Mil Med.* 2006;7:271-7. [Persian]
- 11- Saberi M, Zaree Mahmodabady A. The protective effects of N-acetyl-cysteine, Oxo-thiazolidine-carboxylate, acetaminophen and their combinations against sulfur mustard cytotoxicity on human skin fibroblast cell line (HF2FF). *Iran Biomed J.* 2009;14(3):149-55. [Persian]
- 12- Silvio DF, Alberto I, Francesco D, Roumen M, Balansky M. Mechanisms of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points. *Carcinogenesis.* 2001;22:999-1013.
- 13- Bobb AJ, Arfsten DP, Jederberg W. N-acetyl-L-cysteine as prophylaxis against sulfur mustard. *Mil Med.* 2005;1:12-6.
- 14- Yan CYI, Ferrari G, Greene LA. N-acetylcysteine promoted survival of PC12 cells is glutathione-independent but transcription-dependent. *J Biol Chem.* 1995;270:26827-32.
- 15- Lindsay CD, Hambrook JL. Disopropyl glutathione ester