

Study of the Effects of Hexamethylenetetramine on Decrease of Defects of the Lung Tissue in the Rat Exposed to Sulfur Mustard

Kaka G.R., Ph.D., Sadraie S.H., Ph.D.*, Mirshafiey Gh., M.Sc., Abdi Z., M.Sc., Jafarie M., Ph.D.

** P.O.Box:19395-6558 Anatomy Department, Baqiyatallah Medical Sciences University, Tehran Iran*

Abstract

Purpose: The aim of this study was to evaluate the effects of HMT on protection of lung tissue exposed to HD in the rat.

Materials and Methods: In this study twenty Albino Wister adult male rats weighting 200±20 gram were used. Rats divided randomly into 4 groups (each group has 5 rats) as below: Normal saline group (NS), HMT group, HD group (0.25% HD) and HD+HMT group. Normal saline and HD solution were injected by intra tracheal catheter. Animals in HMT and HD+HMT groups received HMT by intra peritoneal injection for 14 days daily. All rats were killed after 14 days, a part of lung tissue were removed, fixed and processed for histological evaluation by H&E staining and apoptotic cell death study by TUNEL kit. In addition, biochemical study (catalase enzyme) was measured in all groups.

Results: Histological examination and cell counting data revealed that there were no significant differences between Saline & HMT groups. Alveolar hemorrhage and inflammation, as well as, the number of apoptotic cells in the HD group was significantly increased when compared to HD+HMT group.

Conclusion: HMT have prophylactic & therapeutics effects in the lung tissue against HD.

Key Words: Sulfur mustard, Lung tissue, Hexamethylenetetramine

بررسی اثر هگزامتیلن تترآمین در کاهش آسیب سلولی بافت ریه موش‌های صحرائی آلوده به سولفور موستارد

غلامرضا کاکا Ph.D.*، سید همایون صدرایی Ph.D.**، غلامعلی میرشفیعی M.Sc.*، مهدی صابری Ph.D.***،
مهوش جعفری Ph.D.***

* مرکز علوم اعصاب کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا..... (عج)، تهران، ایران
** گروه آناتومی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا..... (عج)، تهران، ایران
*** گروه فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا..... (عج)، تهران، ایران
**** گروه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا..... (عج)، تهران، ایران
تاریخ وصول: اردیبهشت ماه ۸۹، تاریخ پذیرش: خرداد ماه ۸۹

چکیده

هدف: بررسی میزان اثر بخشی داروی فوق الذکر در جلوگیری از آسیب‌های بافت ریه ناشی از HD در محیط In vivo

مواد و روش‌ها: در این تحقیق از تعداد ۲۰ سر موش صحرائی نر بالغ نژاد Albino wistar به وزن 20 ± 20 گرم استفاده شد. موش‌ها به‌صورت تصادفی به ۴ گروه ۵ تایی شامل گروه نرمال سالین (Normal Saline (NS)، گروه داروی HMT به تنهایی، گروه HD با دوز ۲۵٪، درصد و گروه درمان با HMT تقسیم شد. NS و محلول HD به‌صورت داخل تراشه‌ای در گروه‌های مربوط تزریق شد. گروه‌های فقط دارو و درمان با HMT به مدت ۱۴ روز دارو را به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند. در پایان آزمایش حیوانات کشته شده و قسمتی از بافت ریه تثبیت شد. پردازش بافتی برای مطالعه میزان التهاب و مرگ سلولی در بافت ریه به‌وسیله رنگ آمیزی‌های هماتوکسیلین-ئاوزین و TUNEL انجام شد. در ضمن میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در پلاسما نیز اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: بررسی نتایج حاصل هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری را بین دو گروه NS و فقط HMT در خصوص پارامترهای ارزیابی شده نشان نداد. نتایج هیستوپاتولوژی ادم ریوی نشان داد که در گروه HD میزان ادم ریوی به شدت افزایش یافته است. در حالی‌که داروی HMT توانست از افزایش ادم ریوی جلوگیری کند. نتایج بررسی آنزیمی نشان دهنده افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم CAT گروه HD نسبت به گروه NS است. داروی HMT در گروه درمانی از افزایش فعالیت این آنزیم نسبت به گروه HD جلوگیری کرد. نتایج بررسی درصد سلول‌های آپوپتوتیک یا Apoptotic Index (AI) نشان داد که HD سبب افزایش معنی‌دار AI در گروه HD در مقایسه با گروه NS می‌شود. همچنین داروی HMT به شکل معنی‌داری از بروز مرگ سلولی پارانشیم ریه در مقایسه با گروه HD ممانعت کرد.

نتیجه‌گیری: هگزامتیلن تترآمین از التهاب و مرگ سلولی دیواره آلوئولی بافت ریه پس از مواجهه ریه با سولفور موستارد کاسته و از افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در پلاسما نیز جلوگیری می‌کند.

کلیدواژه‌ها: سولفور موستارد، بافت ریه، هگزامتیلن تترآمین

مقدمه

است [۲۱] این عامل باعث الکلیه شدن ترکیبات سلول شده و منجر به توقف سیکل سلول، ساخته شدن و رها شدن

سولفور موستارد (Sulfur mustard) (HD) یا گاز خردل یک عامل تخریب کننده سلول با خواص موتاژنیک در سلول‌ها

آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، گروه آناتومی، صندوق
پستی: ۱۹۳۹۵-۶۵۵۸
E-mail: h_sadraei@yahoo.com

و درمانی این دارو در جلوگیری از آثار تخریبی HD و اهمیت بررسی آن در محیط In vivo در حیوانات آلوده به HD انجام شد.

مواد و روش‌ها

به منظور انجام تحقیق حاضر تعداد ۲۰ سر موش صحرایی نژاد «Albino-wistar» با وزن 20 ± 20 گرم از مؤسسه تحقیقاتی پاستور خریداری شد. HD به صورت محلول با غلظت ۰/۲۵ درصد (HD با خلوص نزدیک به ۱۰۰ درصد به میزان ۰/۲۵ میکرولیتر در ۹۹/۷۵ میکرولیتر نرمال سالین) آماده شد. داروی HMT به صورت پودر از شرکت سینا دارو تهیه و با غلظت یک درصد آماده شد. حیوانات تحت شرایط یکسان از نظر غذا، نور، آب و حرارت نگهداری شدند و سپس به صورت تصادفی در چهار گروه مساوی ۵ تایی به ترتیب زیر تقسیم بندی شدند:

گروه یک حلال (NS: Normal Saline): رت‌های این گروه یک‌بار مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بر کیلوگرم NS را به صورت داخل تراشه‌ای با استفاده از سرنگ انسولین دریافت نمود.

گروه دو دارو (HMT): این گروه داروی HMT را به میزان ۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی دریافت نمود. گروه سه خردل (HD): این گروه محلول HD را به میزان ۱۰۰ میکرولیتر بر کیلوگرم به صورت داخل تراشه‌ای تنها یک‌بار دریافت نمود.

گروه چهار درمان (HD+HMT): این گروه یک ساعت پس از دریافت محلول HD، داروی HMT را دریافت نمود.

به منظور تزریق داخل تراشه‌ای حیوانات با استفاده از کتامین «Ketamine» با دوز ۹۰ میلی گرم بر کیلوگرم و زایلیزین «Xylezine» با دوز ۸ میلی گرم بر کیلوگرم بی‌هوش و ناحیه جلوی گردن در شرایط استریل جراحی شد و نای در معرض دید قرار گرفت و پوست پس از تزریق بخیه شد. گروه‌های دو و چهار به مدت ۱۴ روز، روزانه یک‌بار HMT را دریافت نمود.

بررسی آنزیمی

پس از پایان ۱۴ روز حیوانات بیهوش شده با استفاده از سرنگ ۵ سی سی، مقدار ۳-۵ سی سی خون از قلب گرفته و

واسطه‌های التهابی و سیتوکین‌های التهابی وسیعی می‌شود [۳ و ۴]. این عامل شیمیایی در جنگ تحمیلی عراق علیه ایران به عنوان یک سلاح بیولوژیکی به طور گسترده استفاده شد [۵ و ۶]. چشم، پوست و دستگاه تنفسی از اعضای هستند که توسط HD به طور مستقیم آلوده و سبب التهاب و آسیب بافتی می‌شوند [۷ و ۸]. التهاب ریوی باعث ارتشاح نوتروفیل‌ها در فضای آلوئولی و بافت بینابینی می‌شود و در مجموع سلول‌های التهابی در لایه اپیتلیوم تجمع می‌یابند. افزایش تدریجی سلول‌های التهابی در فضاهای هوایی و بافت بینابینی طی التهاب ریوی حاد دیده می‌شود که به دنبال آن سلول‌های التهابی در نقاط التهاب باعث رها شدن عوامل سمی مختلفی همانند پروتئازها و رادیکال‌های آزاد می‌شوند که منجر به آسیب سلول‌های پارانشیم شده و این امر باعث مرگ سلولی (آپوپتوزیس و نکروزیس) در سلول‌های پارانشیم ریوی می‌شود [۹، ۱۰]. با وجود تحقیقاتی که تا کنون صورت گرفته است، هیچ درمان قطعی برای جلوگیری و درمان عوارض ناشی از HD مشخص نشده است. از جمله داروهای بررسی شده داروی هگزامتیلن تتراآمین Hexamethylentetramine (HMT) است. این دارو بیش از ۱۳۰ سال است که شناخته شده و در پزشکی و صنعت دارای کاربردهای مختلفی است [۱۱]. در پزشکی HMT به عنوان یکی از داروهای ضد باکتریایی و ضد عفونت ادراری شناخته شده و چنین گزارش شده که توانایی واکنش با HD را داشته و قادر است از آثار سوء HD بر سلول‌های بدن بکاهد [۱۲]. تحقیقی که توسط دیلر (Diller) در سال ۱۹۷۸ میلادی در محیط In vivo انجام شد، نشان داد که وی HMT را قبل و بعد از مواجهه مدل حیوانی با فسژن تجویز کرده و بافت ریه این حیوانات را در گروه‌های مختلف بررسی نموده است و نتایج مثبتی از HMT در کاهش آثار سوء عامل فسژن را گزارش نمود [۱۳]. صابری نیز اثر حفاظتی HMT را در برابر تخریب HD در محیط کشت بر سلول‌های فیرو بلاست گزارش کرد [۱۴] اما اندرو (Andrew) آثار محافظتی HMT را بر رده سلول‌های اپیتلیال دستگاه تنفسی فوقانی در محیط کشت در مقابل HD مشاهده نکرد [۱۵]. مطالعه حاضر با توجه به وجود گزارش‌های متفاوت در زمینه تأثیرات حفاظتی

تجزیه و تحلیل آماری

در تجزیه و تحلیل اطلاعات از آزمون آماری ANOVA یک طرفه بر اساس Tukey و از نرم افزار SPSS نسخه ۱۳/۵ استفاده شد. مقادیر ارایه شده در نمودارها و جداول بر حسب $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ است.

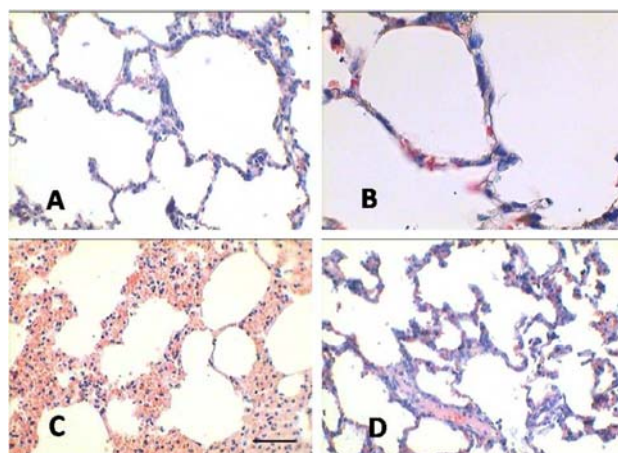
یافته‌ها

نتایج هیستوپاتولوژی ادم ریوی

در بررسی نتایج حاصل در گروه‌های NS و HMT هیچ‌گونه ادم ریوی مشاهده نشد. در گروه HD میزان ادم ریوی به ۳۷/۵ درصد رسید. در گروه HD+HMT میزان ادم ریوی بسیار کم و مشابه گروه‌های NS و HMT بود (شکل ۱ و جدول ۱).

جدول ۱. مقایسه مشاهدات هیستوپاتولوژیک عارضه ریوی در گروه‌های مختلف بر حسب درصد

عارضه گروه	ادم ریوی
NS	۰/۰٪
HMT	۰/۰٪
HD	۳۷/۵٪
HD+HMT	۳/۵٪



شکل ۱. تصاویر ادم ریوی. دیواره آلوئولی در گروه سالین (A) و گروه فقط دارو (C) بدون افزایش ضخامت مشاهده می‌شود. در مقایسه ضخامت دیواره آلوئولی و پر خونی عروق بین گروه‌های مختلف ادم ریوی در گروه HD (C) بیش از هر سه گروه دیگر است. در گروه درمان با HMT (D) این دارو توانسته است به میزان معنی‌داری از افزایش ضخامت دیواره آلوئولی و ادم ریوی در مقابل HD جلوگیری کند. (طول بار ۵۰ میکرومتر، رنگ‌آمیزی: هماتوکسیلین-ئوزین).

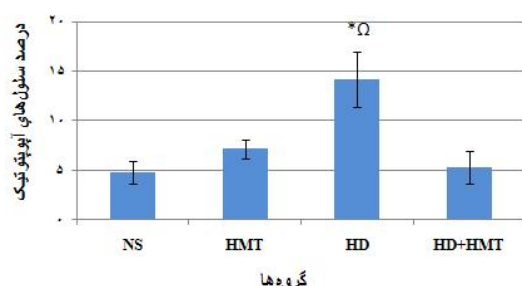
فسفات شستشو شده و سپس از محلول Anti-Digoxigenin Conjugate به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق استفاده شد. سپس شستشوی برش‌های بافتی در بافر فسفات چهار مرتبه انجام و آغشته کردن لام‌ها در ماده Diaminobezidine به مدت ۳۰ دقیقه و غوطه‌ور ساختن نمونه‌ها در سه ظرف آب مقطر دو بار تقطیر هر کدام به مدت ۱ دقیقه صورت گرفت. در مرحله آخر به منظور رنگ‌آمیزی افتراقی از متیل گرین ۰/۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. در پایان رنگ‌آمیزی TUNEL، هسته سلول‌های سالم به رنگ سبز و هسته سلول‌های آپپتوتیک به رنگ قهوه‌ای خواهد شد.

مطالعه سلول‌های آپپتوتیک با استفاده از

شاخص آپپتوتیک (AI: Apoptotic Index)

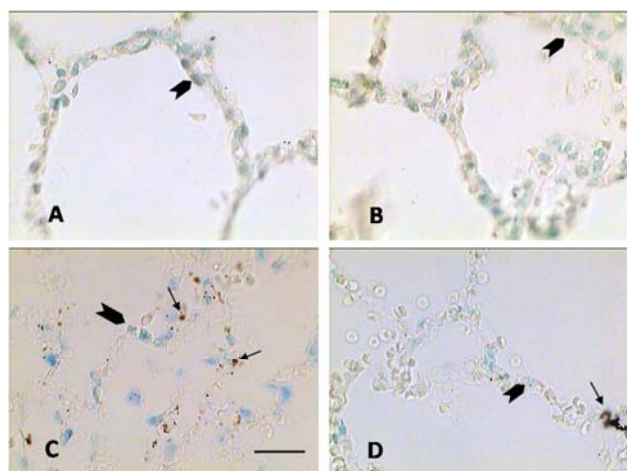
در بررسی میزان آپپتوزیس در بافت ریه تعداد سلول‌های آلوئولار نوع I سالم و آپپتوتیک را در دیواره آلوئولی در مقاطع بافتی با بزرگنمایی ۱۰۰۰ در ۱۰ زمینه به‌طور تصادفی شمارش کرده و درصد AI که شامل درصد نسبت تعداد سلول‌های آپپتوتیک آلوئولار نوع I به سلول‌های سالم آلوئولار نوع I برای کلیه مقاطع به دست آمد و برای هر گروه ۱۰ مقطع متفاوت بررسی شد.

ریه در گروه‌های مختلف نشان داد که HD سبب افزایش معنی‌دار AI در گروه HD در مقایسه با گروه NS شده است ($P=0.004$). میزان AI در گروه دارو نسبت به گروه NS کمی افزایش نشان داد اما این افزایش معنی‌دار نبود. همچنین نتایج نشان می‌دهد که استفاده از داروی HMT بعد از مواجهه حیوان با HD به شکل معنی‌داری از بروز مرگ سلولی پارانشیم ریه در مقایسه با گروه HD جلوگیری کرده است ($P=0.007$) (شکل‌های ۳ و ۴).



شکل ۳. نمودار درصد سلول‌های آپپتوتیک (Apoptotic Index: AI) را در پارانشیم ریه در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد. HMT در گروه فقط دارو افزایش مختصر و غیر معنی‌داری را در AI نسبت به گروه NS نشان می‌دهد. میزان AI در گروه HD به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه NS افزایش یافته است. داروی HMT نیز در گروه HD+HMT به‌طور معنی‌داری از AI نسبت به گروه HD جلوگیری کرده است. * - نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه NS

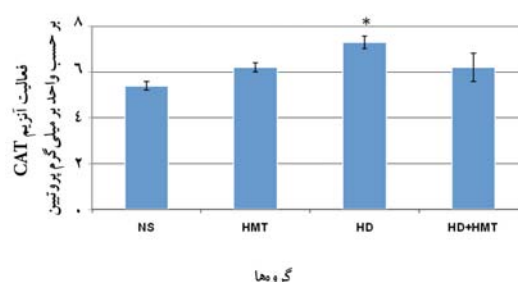
Ω - نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه HD+HMT



شکل ۴. تصاویر بافت ریه رنگ‌آمیزی شده به روش TUNEL برای تعیین مرگ سلولی از نوع آپپتوز. در گروه‌های مختلف هسته سلول‌های سالم به رنگ سبز (Arrow Head) و هسته سلول‌های آپپتوتیک (Arrow) به رنگ قهوه‌ای تیره نشان داده شده‌اند. همان‌طور که ملاحظه می‌شود سلول‌های آپپتوتیک در گروه‌های سالین (A)، فقط دارو (B) و درمان (D) بسیار کم دیده می‌شود. در حالی که در گروه HD (C) تعداد سلول‌های آپپتوتیک نسبت به سه گروه دیگر به شدت افزایش نشان می‌دهد (طول بار ۱۰ میکرومتر). رنگ آمیزی: TUNEL و رنگ آمیزی زمینه: Light green.

بررسی نتایج فعالیت آنزیم CAT

نتایج حاصل بیانگر افزایش غیر معنی‌دار فعالیت آنزیم CAT گروه HMT نسبت به گروه NS بوده است. میزان افزایش فعالیت این آنزیم در گروه HD نسبت به گروه NS به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P=0.035$). داروی HMT در گروه درمانی HD+HMT توانست از افزایش فعالیت این آنزیم در مقابل HD جلوگیری کند که این اختلاف نسبت به گروه HD معنی‌دار نبود (شکل ۲).



شکل ۲. نتایج آماری فعالیت آنزیم CAT بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین. همان‌گونه که نمودار نشان می‌دهد HD موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم شده است که این میزان به‌صورت معنی‌داری بیش از گروه NS است. در گروه HD+HMT دارو از افزایش فعالیت آنزیم به‌طور نسبی ممانعت کرده است اما با هیچ‌کدام از گروه‌های HD و NS اختلاف معنی‌دار نداشته و در وضعیتی بینابین قرار دارد. * - نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه NS

نتایج بررسی شاخص سلول‌های آپپتوتیک

بررسی تعداد سلول‌های آپپتوتیک یا AI در پارانشیم

بحث

در تحقیق حاضر نتایج نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار التهاب در موش‌های آلوده به HD در مقایسه با موش‌های گروه‌های NS، HMT و HD+HMT است که این امر نشانگر اثر HD بر افزایش التهاب و در مقابل تاثیر مطلوب HMT در گروه درمان در مقابل افزایش این عارضه است. Warthin & weller مطالعه‌ای که روی داوطلبان انسانی انجام دادند ارتشاح لکوسیت‌ها را سی دقیقه بعد در محلی که در معرض HD بوده‌اند، گزارش نمودند که تا ۶ روز بعد نیز پایدار بود [۱۸]. در مدل خوکچه هندی که با HD آسیب دیده بود حضور پلی مورفونوکلئارها در زخم‌های ناشی از HD سه ساعت بعد از ایجاد آسیب گزارش شد [۱۹]. در مطالعه دیگر مشاهده شد که تزریق داخل تراشه‌ای ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم CEES (یکی از آنالوگ‌های HD) یک ساعت بعد از مواجهه باعث ایجاد علائمی از سوختگی شیمیایی با مهاجرت پلی‌مورفونوکلئار و لکوسیت‌های ائوزنوفیلی به برونشول‌ها و نواحی آلئولی ریه موش‌های صحرایی شد [۲۰]. آسیب ریوی پیش‌رونده و فیروز ریوی ایجاد شده به وسیله HD در نتیجه اختلال در سیستم‌های کنترل ماکروفاژ- مونوسیت ریوی است که این امر باعث مهاجرت نوتروفیل‌ها به فضاهای هوایی ریه و منجر به توسعه تدریجی از عفونت‌های آلئولی و التهاب مزمن می‌شود [۲۱]. محققان حاضر نیز در بررسی‌های قبلی خود نشان داده‌اند که در همین مدل حیوانی، تعداد ماست سل‌های موجود در پرده جنب احشایی در گروه‌های آلوده به HD نسبت به گروه NS افزایش یافت و داروی HMT موجب جلوگیری از افزایش سلول‌های ماست سل شد [۲۲]. در مجموع نتایج التهاب مطالعه حاضر با نتایج گزارش شده که HD موجب التهاب در پارانشیم ریوی می‌شود تطابق دارد. HMT به دلیل خاصیت ضد عفونی‌کنندگی از ارتشاح سلولی بیش حد جلوگیری کرده و در نتیجه مانع التهاب زیاد در اپی‌تلیوم ریه می‌شود و باعث حفاظت بافت ریه در برابر آثار سمی HD می‌شود.

در بررسی نتایج بیوشیمی در تحقیق حاضر فعالیت آنزیم CAT در گروه HD در مقایسه با گروه NS افزایش معنی‌داری را نشان داد. این نتیجه با نتایج به‌دست آمده از مطالعات قبلی مبنی بر افزایش رادیکال‌های آزاد و سوپراکسید پس از مواجهه با HD در هر دو محیط In vivo و In vitro همسو است [۲۳]. عدم افزایش این آنزیم در گروه HD+HMT را شاید بتوان به عملکرد HMT در مقابل افزایش رادیکال‌های آزاد در پلاسمای خون ارتباط داد. مکانیسم عمل HMT ناشی از خاصیت اتم‌های نیتروژن نوکلئوفیلیک HMT است؛ زیرا نشان داده شده که این اتم‌ها توانایی ترکیب با HD را در محیط In vitro در خارج از سلول داشته و مانع ورود موستارد به درون سلول‌ها می‌شود [۱۲ و ۱۳]. در تأیید نتایج حاضر راپنیو و همکاران (Rappeneau et al.) مشاهده کردند که ترکیب داروهای NAC و HMT باعث جلوگیری از آثار سمی HD بر سلول‌های رده 16HBE140 شد [۲۴]. همچنین مشاهده شد که ترکیب HMT با GSH باعث حفاظت سلول‌های رده SVK₁₄ در برابر سمیت HD شد [۱۲]. کاتالاز (CAT) یکی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت سیستم دفاعی بدن است. در شرایط طبیعی تعادلی مشخص بین تولید ROS و دفاع آنتی‌اکسیدانتی وجود دارد. عدم تعادل این روند منجر به آسیب اکسیداتیو می‌شود که استرس اکسیداتیو (Oxidative Stress) نامیده می‌شود. عوامل شیمیایی از طریق تولید ROS می‌تواند به سلول‌ها آسیب برساند. ROS به ویژه رادیکال‌های آزاد قادر است به‌طور غیر اختصاصی با لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک واکنش داده و باعث اختلال در ساختمان و عمل سلول‌ها شوند [۲۵]. دفاع در برابر رادیکال‌های آزاد توسط مولکول‌های آنتی‌اکسیدان صورت می‌گیرد. آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی موجود در بدن، سیستم اصلی دفاعی بدن در برابر آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد است. در شرایط طبیعی فعالیت CAT در پلازما پایین است و خواص آنتی‌اکسیدانتی آن وابسته به مولکول‌های کوچک مثل اسکوربیک اسید، بیلی

HMT در شرایط محیط کشت است. همچنین در تحقیقی دیگر صابری و همکاران (Saberi et al.) [۱۴] نقش محافظتی HMT را در برابر مرگ سلولی رده سلولی HF2FF تحت تأثیر HD اثبات کردند. استفاده از HMT در محیط کشت روی سلول‌های اپیتلیال ریه بعد از مواجهه با HD هیچ‌گونه نقش محافظتی را روی این سلول‌ها در جلوگیری از مرگ سلولی نداشته است [۱۲] همچنین اندرو (Andrew) مطرح کرد که این دارو در محیط کشت بر سلول‌های اپیتلیال دستگاه تنفسی فوقانی در برابر HD اثر محافظتی ندارد [۱۵]. البته این نتایج متناقض را شاید بتوان به نوع سلول‌های مورد مطالعه، نوع محیط کشت و شرایط کاری دیگر ارتباط داد. ولی با این حال باید تحقیقات بیشتری در مورد آثار محافظتی HMT در برابر HD در هر دو محیط In vitro و In vivo انجام شود.

تحقیق حاضر نشان داد که HMT پس از مواجهه موش‌های صحرایی آلوده به HD می‌تواند از افزایش التهاب و مرگ سلولی در پارانشیم ریه و همچنین افزایش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز پلاسما جلوگیری کند.

تقدیر و تشکر

با تشکر از اساتید و همکاران ارجمند گروه‌های آناتومی، بیوشیمی، فارماکولوژی و پاتولوژی دانشگاه که زحمات فراوانی را در پیشبرد این طرح برعهده داشتند همچنین ریاست محترم پژوهشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) و ریاست محترم مرکز آسیب‌های شیمیایی که در تصویب و تأمین هزینه این طرح ما را یاری نمودند.

همان‌گونه که نتایج نشان می‌دهد HMT توانسته به‌صورت قابل ملاحظه‌ای از افزایش ادم ریوی در برابر آسیب بافت ریه با HD جلوگیری کند.

روبین، اسید اوریک، فریتین و ترانسفرین است [۲۳].

مطالعات ثابت کرده است که آنزیم SOD اولین سد دفاعی در مقابل رادیکال‌های آنیون سوپر اکسید است که آن را به H_2O_2 تبدیل نموده و این محصول خود توسط CAT به آب تبدیل می‌شود [۱۶] بنابراین افزایش فعالیت آنزیم CAT در پلاسما بیانگر فعال شدن سیستم دفاعی آنزیمی سلول برای خنثی کردن رادیکال‌های آزاد تولید شده است. البته مکانیسم دقیق افزایش فعالیت این آنزیم هنوز مشخص نشده است و احتمالاً می‌توان افزایش بیان ژنومیک این آنزیم را به دلیل ایجاد سیگنال‌های القا شده در بافت و سلول‌ها دانست [۲۶].

نتایج تحقیق حاضر همچنین نشان داد که HMT پس از مواجهه حیوان با HD می‌تواند از میزان مرگ سلولی پارانشیم ریه به‌طور معنی‌داری بکاهد. مولکول HMT با داشتن چهار اتم نیتروژن نوکلئوفیل یک توانایی ترکیب با یون اپی سولفونیوم حاصل از تجزیه HD را داشته [۱۵] و مانع از آثار سمی HD بر ماکرومولکول‌های سلولی شده و به دنبال آن از مرگ سلولی جلوگیری می‌کند [۱۲]. برخی تحقیقات نشان داده‌اند که HMT به عنوان یک عامل محافظتی در برابر عامل شیمیایی فسژن به شمار می‌رود و مانع از واکنش فسژن با ماکرومولکول‌های سلولی می‌شود [۱۳]. راپنیو و همکاران (Rappeneau et al.) مشاهده کردند که ترکیب NAC و HMT باعث جلوگیری از مرگ و میر سلولی ناشی از آثار سمی HD بر سلول‌های 16HBE140 می‌شود [۲۴]. در مطالعه دیگری که روی سلول‌های رده نوموسیت انسانی A549 در محیط کشت در برابر HD انجام شد، مشاهده شد وقتی که HMT به محیط کشت اضافه می‌شود باعث ایفای نقش محافظتی در مقابل مرگ سلولی می‌شود [۱۲] که این امر نشانگر نقش حفاظتی

References

1. Kehe K, Szinicz L. Medical aspects of sulfur mustard poisoning. Toxicology 2005; 214(3):198-209.
2. Hosseini-khalili A, Haines DD, Modirian E,

- Sorosh M, Khateri S, Joshi R, et al. Mustard gas exposure and carcinogenesis of lung. Mutat Res 2009; 678(1):1-6.

3. **Das SK, Mukherjee S, Smith MG, Chatterjee D.** Prophylactic protection by N-acetylcysteine against the pulmonary injury induced by 2-chloroethyl ethyl sulfide a mustard analogue. *J Biochem Mol Toxicol* 2003;17(3):177-84.
4. **Arroyo CM, Burman DL, Kahler DW, Nelson MR, Corun CM, Guzman JJ, et al.** TNF-alpha expression patterns as potential molecular biomarker for human skin cells exposed to vesicant chemical warfare agents: sulfur mustard (HD) and Lewisite (L). *Cell Biol Toxicol* 2004 Nov;20(6):345-59.
5. **Balali-mood M, Hefazi M.** Comparison of Early and Late Toxic Effects of Sulfur Mustard in Iranian Veterans. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006; 99(4): 273-82.
6. **Kehe K, Thiermann H, Balszuweit F, Eyer F, Steinritz D, Zilker T.** Acute effects of sulfur mustard injury--Munich experiences. *Toxicology* 2009; 263(1):3-8.
7. **Ghanei M, Harandi AA.** Lung carcinogenicity of sulfur mustard. *Clin Lung Cancer* 2010;11(1):13-7.
8. **Gao X, Ray R, Xiao Y, Barker PE, Ray P.** Inhibition of sulfur mustard-induced cytotoxicity and inflammation by the marolide antibiotic roxithromycin in human respiratory epithelial cells. *BMC Cell Biol* 2007; 24; 8-17.
9. **Pant SC, Vijayaraghavan R.** Histomorphological and histochemical alterations following short-term inhalation exposure to sulfur mustard on visceral organs of mice. *Biomed Environ Sci* 1999; 12(3): 201-13.
10. **Allon N, Amir A, Manisterski E, Rabinovitz I, Dachir S, Kadar T.** Inhalation exposure to sulfur mustard in the guinea pig model: clinical, biochemical and histopathological characterization of respiratory injuries. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;241(2):154-62.
11. **Swift LP, Cutts SM, Rephaeli A, Nudelman A, Phillips DR.** Activation of Adriamycin the PH-dependent Formaldehyde releasing prodrug hexamethylenetetramine. *Mol Cancer Ther* 2003 ;2(2):189-98.
12. **Lindsay CD, Hambrook JL.** Protection of A549 cells against the toxic effects of sulphur mustard by hexamethylenetetramine. *Hum Exp Toxicol* 1997;16(2):106-14.
13. **Diller WF.** Medical phosgene problems and their possible solution. *J Occup Med* 1978; 20(3):189-93.
14. **Saberi M, Zareie A, Pirzad j, Golmanesh L, Eimani H, Pourheidari GH.** Study of the prophylactic effects of hexamethylenetetramine on the HF2FF cell line exposed to sulfur mustard. *J Military Medicine* 2006; 7(4):271-277.
15. **Andrew DJ, Lindsay CD.** Protection of human upper respiratory tract cell lines against sulphur-mustard toxicity by hexamethylenetetramine (HTM). *Hum Exp Toxicol* 1998 ;17(7):373-9.
16. **Yoo DG, Song YJ, Cho EJ, Lee SK, Park JB, Yu JH, et al.** Alteration of APE1/ref-1 expression in non-small cell lung cancer: the implications of impaired extracellular superoxide dismutase and catalase antioxidant systems. *Lung Cancer* 2008 ;60(2):277-84.
17. **Kohlhase C, Maxeiner H.** Morphometric investigation of emphysema aquosum in the elderly. *Forensic Sci Int* 2003;8;134(2-3):93-8.
18. **Vogt RF Jr, Dannenberg AM Jr, Schofield BH, Hynes NA, Papirmeister B.** Pathogenesis of skin lesions caused by sulfur mustard. *Fundam Appl Toxicol* 1984; 4: 71-83.
19. **Millard CB, Bongiovanni R, Broomfield CA.** Cutaneous exposure to bis-(2-chloroethyl) sulfide results in neutrophil infiltration and increased solubility of 180,000 Mr subepidermal collagens. *Biochem Pharmacol* 1997 ;53(10):1405-12.
20. **Ruff AL, Dillman JF 3rd.** Sulfur mustard induced cytokine production and cell death: Investigating the potential roles of the p38, p53, and NF-kappaB signaling pathways with RNA interference. *J*

- Biochem Mol Toxicol 2010; 24(3):155-64.
21. **Weber WM, Kracko DA, Lehman MR, Irvin CM, Blair LF, White RK, et al.** Inhalation exposure systems for the development of rodent models of sulfur mustard-induced pulmonary injury. *Toxicol Mech Methods* 2010; 20(1):14-24.
 22. **Abdi Z, Sadraie H, Kaka GR, Jafarie M, Saberi M.** Study of the Effects of Hexamethylenetetramine (HMT) on the number of pleural visceral layer mast cells in rats after exposure to sulfur mustard (HD). *J . Zanzan University of Medical Sciences.* 2009; 16(65):31-40.
 23. **Naghii MR.** Sulfur mustard intoxication, oxidative stress and antioxidants. *Mil Med.* 2002; 167(7): 573-5.
 24. **Rappeneau S, Baeza-sauiban A, Marano F, Calvet J.** Efficient protection of human bronchial epithelial cells against sulfur and nitrogen mustard cytotoxicity using drug combinations. *Toxicol. Sci* 2000; 58(1):153-66.
 25. **Heathcote PS, Mactaggart PN, Boston RJ, James AN, Thompson LC, Nicol DL.** Health-related quality of life in Australian men remaining disease-free after radical prostatectomy. *Med J Aust* 1998;168(10): 483-6.
 26. **Jafari M.** Dose and time dependent effects of sulfur mustard on antioxidant system in liver and brain of rat. *Toxicology* 2007;231(1):30-9.