©2015 DAZCo, *Danesh Afarand Zistagen Co., IRAN*
ISSN: 2008-2630 *Quarterly of Iranian Journal of War & Public Health 2015;7(1):1-6*

Apoptosis in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Chemical Victims; 25 Years after Exposure to Mustard Gas

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Alamdar L.[1] *MSc,*
Ghazanfari T.* *PhD,*
Salimi H.[2] *PhD*

How to cite this article
Alamdar L, Ghazanfari T, Salimi H. Apoptosis in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Chemical Victims; 25 Years after Exposure to Mustard Gas. Iranian Journal of War & Public Health. 2015;7(1):1-6.

*Immunoregulation Research Center, Shahed University, Tehran, Iran
[1]Immunoregulation Research Center, Shahed University, Tehran, Iran
[2]Zist Kavosh Iranian (IBRESCO), Tehran, Iran

Correspondence
Address: Immunoregulation Research Center, 4th Floor, Shahed University Research Centers Building, No. 1471, Corner of Mehr Alley, North Karegar Street, Enqelab Square, Tehran, Iran
Phone: +98 2188964792
Fax: +98 2188966310
tghazanfari@yahoo.com

Article History
Received: July 26, 2014
Accepted: August 19, 2014
ePublished: February 19, 2015

ABSTRACT

Aims Mustard gas is an Alkalizing agent and inflammatory stimuli that were used as chemical weapon. Lung problems in people exposed to mustard gas is the major cause of morbidity and mortality in long-term. DNA damage is considered as one of the most important clinical lesions. Typically, apoptosis is occurred during development and aging and as a hemostatic mechanism for maintaining cell populations in tissues and also as a defence mechanism in immune system body reactions or when cells are suffered by toxic agents or illness. The aim of this study was to compare the rate of apoptosis in blood mononuclear cells of chemical victims 25 years after exposure to mustard gas and non-exposured people.

Materials & Methods This case control study was performed at 2014 on 10 veterans as case group selected by random sampling and 11 patients as control group selected by random sampling. 3mL of peripheral blood collected from both groups and gradient Faykl was used to isolation of mononuclear peripheral blood cells. After cells preparing, ELISA kit cell death was used to measure apoptosis. Data were analysed by student-T test.

Findings The mean incidence of apoptosis in control group was 0.533±0.168 and in case group was 0.345±0.116, which was not different significantly (p=0.39).

Conclusion Mustard gas in chronic phase (25 years after exposure) has no effect on apoptosis of peripheral blood mononuclear cells.

Keywords Mustard Gas; Apoptosis; Veterans

CITATION LINKS

[1] Sulfur mustard toxicity: History, chemistry, pharmacokinetics, and pharmacodynamics [2] Public health status of the civil population of Sardasht 15 years following large-scale wartime exposure to sulfur mustard [3] Evaluation of relationship between the serum levels of inflammatory mediators and ocular injuries induced by sulfur mustard: Sardasht-Iran Cohort Study [4] Incidence of lung, eye, and skin lesions as late complications in 34,000 Iranians with wartime exposure to mustard agent [5] Sardasht-Iran cohort study of chemical warfare victims: Design and methods [6] Sulfur mustard toxicity following dermal exposure: Role of oxidative stress, and antioxidant therapy [7] Suppression of inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production by macrolide antibiotics in sulfur mustard-exposed airway epithelial cells [8] Nuclear dependence of sulfur mustard-mediated cell death [9] Interstrand cross-linking of DNA by difunctional alkylating agents [10] Formation of O6-ethylthioethyldeoxyguanosine from the reaction of chloroethyl ethyl sulfide with deoxyguanosine [11] Formation of O6-ethylthioethylguanine in DNA by reaction with the sulfur mustard, chloroethyl sulfide, and its apparent lack of repair by O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase [12] Repair of DNA interstrand cross-links. Mutat Res Repair [13] Apoptosis: A review of programmed cell death [14] The role of fas-fasl signaling pathway in induction of apoptosis in patients with sulfur mustard-induced chronic bronchiolitis [15] Sulfur mustard induces apoptosis in lung epithelial cells via a caspase amplification loop [16] Role of poly (ADP-ribose) polymerase in sulfur mustard toxicity [17] Sulfur Mustard Induces Markers of Terminal Differentiation and Apoptosis in Keratinocytes Via a Ca2+-Calmodulin and Caspase-Dependent Pathway [18] Sulfur mustard induces apoptosis and necrosis in endothelial cells [19] NAD+ levels and glucose uptake of cultured human epidermal cells exposed to sulfur mustard [20] Activation of Poly [ADP-Ribose] Polymerase in Endothelial Cells and Keratinocytes: Role in aninVitroModel of Sulfur Mustard-Mediated Vesication [21] Cell death detection elisa plus [22] Delayed ocular complications of mustard gas poisoning and the relationship with respiratory and cutaneous complications [23] Postexposure application of Fas Receptor Small-Interfering RNA to Suppress Sulfur Mustard-Induced Apoptosis in Human Airway Epithelial Cells: Implication for a Therapeutic Approach [24] Deoxyribonucleic acid damage in Iranian veterans 25 years after wartime exposure to sulfur mustard [25] Bcl-2 Protein Expression in Pulmonary Specimens of Sulfur Mustard Victims

آپوپتوز سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در مصدومان شیمیایی؛ ۲۵ سال پس از مواجهه با گاز خردل

لیلا علمدار MSc
مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
طوبی غضنفری* PhD
مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
حسن سلیمی PhD
شرکت زیست کاوش ایرانیان، تهران، ایران

چکیده

اهداف: گاز خردل ماده‌ای آلکیله‌کننده و محرک التهاب است که به‌عنوان سلاح شیمیایی به‌کار گرفته شد. مشکلات ریوی در افراد مواجه با گاز خردل، اصلی‌ترین عامل ناتوانی و مرگ‌ومیر در درازمدت است. آسیب DNA یکی از مهم‌ترین ضایعات بالینی به‌حساب می‌آید. آپوپتوز به‌طور معمول هنگام تکامل و پیری و به‌عنوان مکانیسمی هموستاتیک برای حفظ جمعیت سلولی در بافت‌ها و همچنین به عنوان مکانیسم دفاعی در واکنش‌های سیستم دفاعی بدن یا هنگامی که سلول‌ها توسط عوامل سمی یا بیماری آسیب می‌بینند، رخ می‌دهد. هدف این مطالعه مقایسه میزان آپوپتوز در سلول‌های تک‌هسته‌ای خونی مصدومان شیمیایی ۲۵ سال پس از مواجهه و افراد غیرمواجه با گاز خردل بود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه مورد- شاهدی در سال ۱۳۹۳ انجام شد و از میان جانبازان شیمیایی ۱۰ نفر به روش نمونه‌گیری تصادفی به‌عنوان گروه مورد و از میان افراد غیرمواجه، ۱۱ نفر به روش نمونه‌گیری تصادفی به‌عنوان گروه شاهد انتخاب شدند. از افراد هر دو گروه ۳سی‌سی خون محیطی جمع‌آوری و جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی به روش گرادیان فایکل انجام شد. پس از آماده‌سازی سلول‌ها، از کیت تشخیص مرگ سلولی به روش الایزا برای سنجش میزان آپوپتوز استفاده شد. از آزمون آماری T استودنت برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد.

یافته‌ها: میانگین میزان بروز آپوپتوز در گروه کنترل ۰/۱۶۸±۰/۵۳۳ و در گروه مورد ۰/۱۱۶±۰/۳۴۵ بود که از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نداشت (p=۰/۳۹).

نتیجه‌گیری: گاز خردل در فاز مزمن (۲۵ سال بعد از مواجهه)، تاثیری بر میزان آپوپتوز سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی ندارد.

کلیدواژه‌ها: گاز خردل؛ آپوپتوز؛ جانبازان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۵/۰۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۵/۲۸
*نویسنده مسئول: tghazanfari@yahoo.com

مقدمه

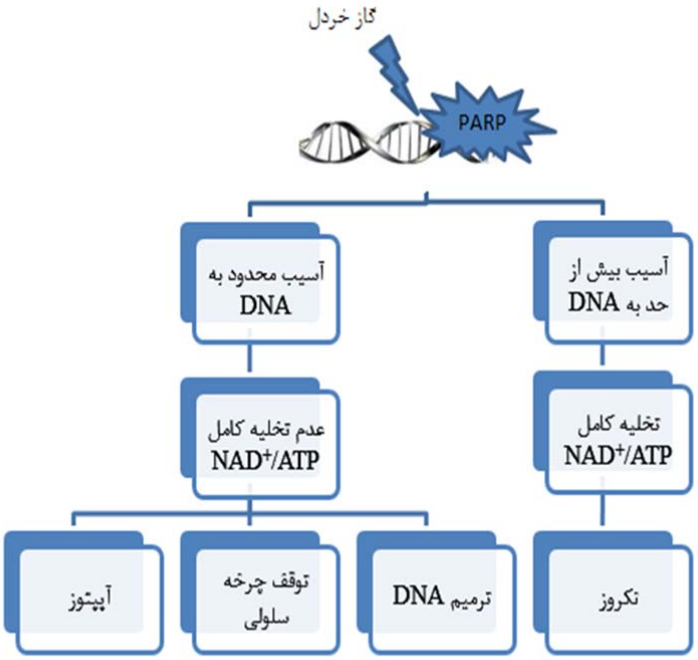
گاز خردل ماده‌ای آلکیله‌کننده و محرک التهاب است که به‌عنوان سلاح شیمیایی طی جنگ جهانی اول و نیز توسط ارتش عراق علیه ایرانیان در جنگ ایران و عراق در دهه ۱۹۸۰ به‌کار گرفته شد. آنالوگ‌های گاز خردل، به‌صورت مایعات آئروسل‌شده‌ای موجود هستند که در بدن مصدومان باقی می‌مانند و از طریق اثر بر پوست، چشم و سیستم تنفسی، باعث انواع ناتوانی‌ها می‌شوند[1, 2].

گاز خردل از طریق استنشاق، پوست یا سطح قدامی چشم جذب می‌شود. عوارض مواجهه با این ماده شیمیایی در اندام‌های مختلف شامل چشم، ریه، پوست، سیستم عصبی، سیستم گوارش، سیستم ایمنی و غیره بروز می‌نماید[3]. عوارض زودرس مواجهه با گاز خردل در همان هفته اول و عوارض دیررس ۱۵-۱۰ سال بعد و حتی در سال‌های طولانی‌تر پس از ضایعه اولیه خود را نشان می‌دهند[4, 5]. بسیاری از مصدومان شیمیایی ایران از عوارض دیررس ناشی از گاز خردل رنج می‌برند[3]. مشکلات ریوی در این افراد، اصلی‌ترین عامل ناتوانی و مرگ‌ومیر در درازمدت است[6]. آسیب‌های چشمی این افراد تا سال‌ها پس از مواجهه به‌صورت پیش‌رونده ادامه دارد[7]. گاز خردل ماده شیمیایی بسیار فعالی است که تقریباً با همه ترکیبات سلول واکنش می‌دهد. ولی آسیب DNA یکی از مهم‌ترین ضایعات بالینی به‌حساب می‌آید. گاز خردل به‌عنوان ماده آلکیله‌کننده در واکنش با DNA فرم‌های تک- و دوعملکردی ایجاد می‌کند. این ترکیبات، ترجیحاً در موقعیت نیتروژن ۷ گوانین و به‌ترتیب در موقعیت‌های نیتروژن ۱ آدنین، نیتروژن ۳ آدنین و اکسیژن ۶ گوانین ایجاد می‌شوند. اکسیژن ۶ گوانین بسیار نادر است، ولی در صورت به‌وجودآمدن به‌عنوان ضایعه بحرانی در نظر گرفته می‌شود؛ چراکه مکانیزم ترمیم DNA در انسان قادر به شناسایی و حذف آن نیست. بنابراین، گاز خردل با ایجاد اکسیژن ۶ گوانین باعث جهش یا خطا در همانندسازی می‌شود. همچنین، کراس‌لینک‌های بین‌رشته‌ای باعث ایجاد "چنگال همانندسازی متوقف" (Stalled Replication Fork) شده و در نهایت منجر به شکست دورشته‌ای می‌شود[8-12].

آپوپتوز به‌طور معمول هنگام تکامل و پیری و به‌عنوان مکانیسمی هموستاتیک برای حفظ جمعیت سلولی در بافت‌ها و همچنین به عنوان مکانیسم دفاعی در واکنش‌های سیستم دفاعی بدن یا هنگامی که سلول‌ها توسط عوامل سمی یا بیماری آسیب می‌بینند، رخ می‌دهد[13]. در مطالعات *این‌ویترو* و *این‌ویوو* که روی گاز خردل و اثر آن بر آپوپتوز صورت گرفته، مشاهده شده است که گاز خردل باعث ایجاد حساسیت به جهش در سرکوب‌کننده‌های تومور نظیر p53 می‌شود که باعث کاهش bcl2 و فعال‌شدن کاسپاز ۳ *این‌ویترو* می‌شود[14]. همچنین، در مطالعه‌ای گزارش شده است که گاز خردل باعث القای مرگ آپوپتوزی در کشت سلول‌های اپیتلیالی نرمال برونش انسانی (NHBE) و سلول‌های اپیتلیالی مسیرهای هوایی کوچک (SAEC) *این‌ویترو* شده است[15]. همچنین، مطالعات *این‌ویوو* روی بافت ریه موش‌هایی که در معرض گاز خردل قرار گرفتند، نشان می‌دهد که بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز افزایش یافته است[14].

PARPs القای گاز خردل را برای مرگ سلولی تعدیل می‌کند. PARP-1 و PARP-2 به‌وسیله ایجاد استرس ژنوتوکسیک در اندام‌های چندسلولی فعال می‌شوند. PARP-1 یکی از اعضای خانواده PARP است که فعالیت شدید آنزیمی دارد و به‌وسیله رشته DNA شکسته‌شده فعال می‌شود. گاز خردل باعث القای استرس ژنوتوکسیک می‌شود که منجر به فعالیت متوالی PARP ظرف مدت یک ساعت در کراتینوسیت‌های انسانی می‌شود (شکل ۱). غلظت بالای گاز خردل قویا PARP-1 را با تخلیه سوبسترای NAD^+ و تشکیل پلیمرهای ADP/ریبوزیل فعال می‌کند. PARP-1 سوبسترای کاسپاز ۳ در فاز آپاپتوز و پروتئازایزومراز در نکروز است. کاسپاز ۳ واسطه برش PARP-1 به‌صورت سریع است که نتیجه آن توقف فعالیت آنزیمی و مصرف انرژی است. کمبود NAD^+ مصرف گلوکز و تشکیل لاکتات را منجر می‌شود. ساخت مجدد NAD^+ باعث تخلیه ذخایر ATP درون‌سلولی می‌شود و کمبود ATP می‌تواند منجر به مرگ سلولی از طریق نکروز شود. با وجود آنکه میزان متوسط گاز خردل استرس ژنوتوکسیک را القا و PARP-1 را فعال می‌کند، اما اثر کمی بر سطح NAD^+ و ATP دارد. بنابراین، حفظ سطح انرژی درون‌سلولی برای شروع آپوپتوز پس از مواجهه با گاز خردل بسیار مهم است[16-20].

با توجه به اثر گاز خردل بر DNA و در نهایت بر روند مرگ سلولی هدف این مطالعه مقایسه میزان آپوپتوز در سلول‌های تک‌هسته‌ای خونی مصدومان شیمیایی ۲۵ سال پس از مواجهه و افراد غیرمواجه با گاز خردل بود.



شکل ۱) نقش PARP در آسیب ناشی از گاز خردل (SM)

مواد و روش‌ها

جامعه آماری این مطالعه مورد- شاهدی که در سال ۱۳۹۳ انجام شد، جانبازان شیمیایی مواجه با گاز خردل که پرونده آنها توسط بنیاد شهید و امور ایثارگران تایید شده بود و گروه غیرمواجهه افرادی که هیچ‌گونه سابقه اثبات‌شده مواجهه با گاز خردل نداشته و در معاینات سالم بوده و بیماری خاصی نداشتند بودند. از میان جانبازان شیمیایی ۱۰ نفر به روش نمونه‌گیری تصادفی به‌عنوان گروه مورد و از میان افراد غیرمواجه، ۱۱ نفر به روش نمونه‌گیری تصادفی به‌عنوان گروه شاهد انتخاب شدند. همه نمونه‌ها مرد و در محدوده سنی ۳۵ تا ۶۲ سال بودند و برای هر گروه سابقه مواجهه یا عدم مواجهه طبق پرونده‌های پزشکی موجود در بنیاد شهید و امور ایثارگران و جانبازان به اثبات رسیده بود. معیارهای خروج از مطالعه عدم تمایل فرد به ادامه همکاری و ازدست‌رفتن نمونه‌ها به‌علت مقدار کم یا غلظت نامناسب بودند. از تمام افراد گروه شاهد و مورد، رضایت‌نامه کتبی برای شرکت در این مطالعه گرفته شد. شرکت یا عدم شرکت افراد در این مطالعه، تاثیری در نحوه نگرش و درمان این افراد نداشت.

استخراج سلول‌های تک‌هسته‌ای: از افراد هر دو گروه مورد و شاهد ۳سی‌سی خون محیطی جمع‌آوری و جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی به روش گرادیان فایکل (Gradiant Ficoll) انجام شد. بدین ترتیب که ۴سی‌سی مایع فایکل در لوله استریل ریخته و خون به‌آرامی به آن اضافه و با ۲۸۰۰دوردردقیقه برای ۲۰دقیقه سانترفیوژ شد. پس از خارج‌کردن لوله از دستگاه، لایه سلول‌های تک‌هسته‌ای جدا و به لوله آزمایش جدید منتقل و با ۱۵۰۰دوردردقیقه برای ۱۰دقیقه سانتریفیوژ شد. محیط کشت خالص روی مایع رویی حاصل اضافه و با ۱۵۰۰دوردردقیقه برای ۱۰دقیقه سانترفیوژ شد تا سلول‌ها شست‌وشو شوند و سپس در ازُت مایع تا زمان استفاده نگهداری شدند.

آماده‌سازی سلول‌ها برای سنجش: در زمان استفاده سلول‌ها یخ‌زدایی شده و مایع محیط کشت قبلی سانتریفیوژ و دور ریخته شد و با استفاده از محیط کشت حاوی سرم جنین گاوی (FBS) ۱۰٪ (Sigma؛ ایالات متحده) مخلوط شد. ۱۰مایکرولیتر از سلول‌ها با استفاده از لام نئوبار شمارش و ۲۰۰هزار سلول در چاهک‌های کشت سلولی ریخته شد. در چاهک‌های کشت سلولی از نسبت‌های سلول‌های کنترل و سلول‌های هدف به‌میزان مورد نظر اضافه و در نهایت به‌وسیله محیط کشت به ۲۰۰مایکرولیتر رسانده برای ۴-۳/۵ساعت در دمای ۳۷°C و ۵٪ دی‌اکسیدکربن انکوبه شد. سپس پلیت برای ۱۰دقیقه در ۲۰۰گرم سانتریفیوژ شد و مایع رویی به‌طور کامل حذف شد. ۲۰۰مایکرولیتر بافر لیز سلولی به رسوب‌های سلولی باقیمانده در ته چاهک‌های قبلی اضافه و برای ۳۰دقیقه در ۲۵°C-۱۵ انکوبه شد.

سنجش به روش الایزا: برای سنجش آپوپتوز از کیت تشخیص مرگ سلولی به روش الایزا (Roche؛ آلمان) استفاده شد. در این کیت، آنتی‌بادی‌های اختصاصی با نام "آنتی- هیستون- بیوتین" موجب اتصال DNAها به ته پلیت‌های کیت شده و سپس آنتی‌بادی‌های دیگری با نام "آنتی- DNA- پراکسیداز"، به DNAهای چسبیده به ته پلیت متصل می‌شوند. آنزیم پراکسیداز که در انتهای دیگر آنتی‌بادی دوم قرار دارد، با سوبسترای خود رنگ سبزی ایجاد می‌کند با دستگاه الایزا قابل سنجش است. برای این سنجش ابتدا ۲۰مایکرولیتر از مایع رویی، محلول لیز سلولی و کنترل مثبت (موجود در کیت) در مرکز مایکروپلیت‌های کوت‌شده کیت، ریخته شد. به هر چاهک ۸۰مایکرولیتر ایمونوریجنت (بافر انکوباسیون، "آنتی- هیستون- بیوتین" و "آنتی- DNA- پراکسیداز") اضافه شد. روی مایکروپلیت‌ها با برچسب‌های داخل کیت پوشانده و برای ۲ساعت در دمای ۲۵°C-۱۵ روی شیکر با ۳۰۰دوردردقیقه قرار گرفت. سپس چاهک‌ها کاملاً تخلیه و ۳بار با ۳۰۰-۲۵۰مایکرولیتر بافر انکوباسیون شست‌وشو شد. ۱۰۰مایکرولیتر محلول ABTS (موجود در کیت) به هر چاهک اضافه و روی شیکر مایکروپلیت با ۲۵۰دوردردقیقه برای ۱۰ تا ۲۰دقیقه (به محض تشکیل رنگ) قرار گرفت. سپس ۱۰۰مایکرولیتر محلول توقف ABTS به هر چاهک اضافه شد. جذب چاهک‌ها در ۴۰۵نانومتر در مقابل "۱۰۰مایکرولیتر محلول ABTS + ۱۰۰مایکرولیتر محلول توقف ABTS" به‌عنوان کنترل سنجیده شد[21].

از نرم‌افزار آماری SPSS 18 و آزمون آماری T استودنت برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد.

یافته‌ها

میانگین میزان بروز آپوپتوز در گروه کنترل ۰/۱۶۸±۰/۵۳۳ و در گروه مورد ۰/۱۱۶±۰/۳۴۵ بود که از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نداشت (p=۰/۳۹).

بحث

آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی در فعالیت‌های زیستی مختلفی از جمله توسعه، ترمیم، پاک‌سازی و بقای بافتی و نیز در نابودی سلول‌های سرطانی دخالت دارد. اختلال در عملکرد آپوپتوز می‌تواند منجر به پیدایش بیماری‌های مختلفی در انسان شود. اختلال در این سیستم بر اثر موارد مختلفی از جمله مواد آلکیله‌کننده امکان‌پذیر است و گاز خردل یکی از موادآلکیله‌کننده است که می‌تواند بر روند مرگ سلولی با فعال‌سازی شدید PARP-1 اثر گذاشته و با توجه به دوز مواجهه، باعث پیشرفت سلول به‌سمت آپوپتوز یا نکروز شود[22]. هدف این مطالعه مقایسه میزان آپوپتوز در سلول‌های تک‌هسته‌ای خونی مصدومان شیمیایی ۲۵ سال پس از مواجهه و افراد غیرمواجه با گاز خردل بود که تفاوت معنی‌داری بین آنها دیده نشد.

رای و همکاران با مطالعه آپوپتوز القاشده توسط گاز خردل در سلول‌های اپیتلیال ریه انسان با استفاده از تکنیک‌های سنجش فعالیت کاسپازی به روش فلوئورومتری و آنالیز ایمونوبلات گزارش کرده‌اند که گاز خردل باعث ایجاد آپوپتوز در سلول‌های اپیتلیالی ریه انسان شده و مسیر کاسپاز ۳ و ۸ به‌شدت فعال می‌شود. همچنین، با استفاده از مهارکننده تتراپپتید کاسپاز ۳ و ۸ دریافتند که مهار کاسپاز ۳ به‌شدت باعث کاهش فعالیت کاسپاز ۸ و کاسپاز ۹ می‌شود و همچنین مهار کاسپاز ۸ باعث کاهش فعالیت کاسپاز ۳ و مهار کامل فعالیت کاسپاز ۹ می‌شود[15].

کیسر با بررسی آپوپتوز سلول‌های اپیتلیالی مسیر هوایی انسان القاشده توسط گاز خردل، کاربرد siRNA-FasR را برای مهار آپوپتوز مورد مطالعه قرار داده و گزارش می‌کند که گاز خردل باعث القای آپوپتوز از طریق پاسخ Fas می‌شود و siRNA فعالیت کاسپاز ۳ القاشده توسط گاز خردل را مهار می‌کند؛ همچنین در مرگ سلولی که با گاز خردل القا شده، هر دو نوع مرگ آپوپتوز و

نکروز دخیل هستند[23] که البته تمامی موارد فوق بر فاز حاد تماس با گاز خردل متمرکز است، در صورتی که مطالعه حاضر بر موارد ۲۵ سال پس از مواجهه با گاز خردل متمرکز است.

بهروان و همکاران با مطالعه DNAی ۲۵ جانباز شیمیایی (۲۵ سال پس از مواجهه با گاز خردل) با روش کامت، آسیب‌دیدگی DNA را در اثر گاز خردل گزارش نموده‌اند[24].

پیرزاد و همکاران گزارش کرده‌اند که مسیر پیام‌رسانی Fas/FasL که باعث آپوپتوز می‌شود، در سلول‌های BAL بیمارانی که تحت اثر گاز خردل قرار گرفته‌اند آسیب دیده که این می‌تواند یکی از عوامل آغازین در پاتوژنز صدمات ریوی در این بیماران باشد[14]. براساس نتایج *روشن‌ضمیر* و همکاران، بیان پروتئین BCL2 در ماکروفاژهای نمونه‌های بیوپسی ریه جانبازان شیمیایی مواجه با گاز خردل افزایش ولی تعداد آنها کاهش یافته است؛ همچنین تعداد لنفوسیت‌ها افزایش یافته ولی بیان BCL2 نسبت به افراد غیرمواجه تغییری نکرده و در مورد نوتروفیل‌ها نه تعداد و نه بیان BCL2 تغییری نداشته ولی بیان این پروتئین در سلول‌های اپیتلیالی و فیبروبلاست‌ها افزایش یافته است[25].

مطالعات بالا نشان‌دهنده اثر گاز خردل بر سلول‌ها و مکانیسم‌های عملکردی مولکول‌های مختلف در سلول‌های ریوی به‌عنوان بافتی مشخص است که اثر گاز خردل بر این سیستم زیستی را نشان می‌دهد. اما در این مطالعه که روی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی انجام گرفت تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. از آن جا که گروه مورد بررسی در این مطالعه از افراد آسیب‌دیده در جنگ بودند جلب رضایت آنها برای همکاری از جمله محدودیت‌های این مطالعه بود. پیشنهاد می‌شود که مطالعات بیشتری برای بررسی آپوپتوز با روش‌های فلوسایتومتری و ایمونوهیستوشیمی در بافت‌های آسیب‌دیده با گاز خردل انجام شود.

نتیجه‌گیری

گاز خردل در فاز مزمن (۲۵ سال بعد از مواجهه)، تاثیری بر میزان آپوپتوز سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی ندارد.

تشکر و قدردانی: از مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی که از نظر مالی این پژوهش را حمایت نموده است تشکر می‌نماییم.

تاییدیه اخلاقی: این پژوهش بخشی از پروژه کوهورت جانبازان شیمیایی سردشت (SCIS) است. پروژه SCIS در کمیته اخلاق پژوهشکده مهندسی و علوم پزشکی جانبازان تصویب شده است.

تعارض منافع: موردی از طرف نویسندگان گزارش نشده است.

منابع مالی: توسط مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی تامین شده است.

منابع

1- Ghabili K, Agutter PS, Ghanei M, Ansarin K, Panahi Y, Shoja MM. Sulfur mustard toxicity: History, chemistry, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. Crit Rev Toxicol. 2011;41(5):384-403.

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 Surg Wound Care. 2003;2(7):7-18.

3- Ghasemi H, Ghazanfari T, Yaraee R, Ghassemi-Broumand M, Soroush MR, Pourfarzam S, et al. Evaluation of relationship between the serum levels of inflammatory mediators and ocular injuries induced by sulfur mustard: Sardasht-Iran Cohort Study. Int Immunopharmacol. 2009;9(13-14):1494-8.

4- Khateri S, Ghanei M, Keshavarz S, Soroush M, Haines D. Incidence of lung, eye, and skin lesions as late complications in 34,000 Iranians with wartime exposure to mustard agent. J Occup Environ Med. 2003;45(11):1136-43.

5- Aragizadeh H, Soroush M-R, Javadi M-A, Azizi F, Ghasemi H, Shams J, et al. Sardasht-Iran cohort study of chemical warfare victims: Design and methods. Arch Iran Med. 2009;12(1):5-14.

6- 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:e7.

7- Gao X, Ray R, Xiao Y, Ray P. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production by macrolide antibiotics in sulfur mustard-exposed airway epithelial cells. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2008;103(3):255-61.

8- Lodhi IJ, Sweeney JF, Clift RE, Hinshaw DB. Nuclear dependence of sulfur mustard-mediated cell death. Toxicol Appl Pharmacol. 2001;170(1):69-77.

9- Lawley PD, Brookes P. Interstrand cross-linking of DNA by difunctional alkylating agents. J Mol Biol. 1967;25(1):143-60.

10- Ludlum DB, Tong WP, Mehta JR, Kirk MC, Papimeister B. Formation of O6-ethylthioethyldeoxyguanosine from the reaction of chloroethyl ethyl sulfide with deoxyguanosine. Cancer Res. 1984;44(12 Part 1):5698-701.

11- Ludlum DB, Kent S, Mehta JR. Formation of O6-ethylthioethylguanine in DNA by reaction with the sulfur mustard, chloroethyl sulfide, and its apparent lack of repair by O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. Carcinogenesis. 1986;7(7):1203-6.

12- Dronkert ML, Kanaar R. Repair of DNA interstrand cross-links. Mutat Res Repair. 2001;486(4):217-47.

13- Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007;35(4):495-516.

14- Pirzad G, Jafari M, Tavana S, Sadrayee H, Ghavami S, Shajiei A, et al. The role of fas-fasl signaling pathway in induction of apoptosis in patients with sulfur mustard-induced chronic bronchiolitis. J Toxicol. 2010. Available from: http://dx.doi.org/10.1155/2010/373612.

15- 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.

16- Debiak M, Kehe K, Bürkle A. Role of poly (ADP-ribose) polymerase in sulfur mustard toxicity. Toxicology. 2009;263(1):20-5.

17- Rosenthal DS, Simbulan-Rosenthal CM, Iyer S, Spoonde A, Smith W, Ray R, et al. Sulfur Mustard Induces Markers of Terminal Differentiation and Apoptosis in Keratinocytes Via a Ca2+-Calmodulin and Caspase-DependentPathway.JInvestDermatol.1998;111(1):64-71.
18- Dabrowska MI, Becks LL, Lelli Jr JL, Levee MG, Hinshaw DB. Sulfur mustard induces apoptosis and necrosis in endothelial cells. Toxicol Appl Pharmacol. 1996;141(2):568-83.
19- Mol MA, van de Ruit A-MB, Kluivers A. NAD+ levels and glucose uptake of cultured human epidermal cells exposed to sulfur mustard. Toxicol Appl Pharmacol. 1989;98(1):159-65.
20- Hinshaw DB, Lodhi IJ, Hurley LL, Atkins KB, Dabrowska MI. Activation of Poly [ADP-Ribose] Polymerase in Endothelial Cells and Keratinocytes: Role in aninVitroModel of Sulfur Mustard-Mediated Vesication. ToxicolApplPharmacol. 1999;156(1):17-29.
21- Roche Diagnostics. Cell death detection elisa plus [Internet]. [Cited: 2014 May 3]. Available from: https://www.google.com/webhp?hl=en&authuser=0#au thuser=0&hl=en&q=cell+death+detection+elisa+plus.
22- Etezad-Razavi M, Mahmoudi M, Hefazi M, Balali-Mood M. Delayed ocular complications of mustard gas poisoning and the relationship with respiratory and cutaneous complications. Clin Experiment Ophthalmol. 2006;34(4):342-6.
23- Keyser BM, Andres DK, Nealley E, Holmes WW, Benton B, Paradiso D, et al. Postexposure application of Fas Receptor Small-Interfering RNA to Suppress Sulfur Mustard-Induced Apoptosis in Human Airway Epithelial Cells: Implication for a Therapeutic Approach. J Pharmacol Exp Ther. 2013;344(1):308-16.
24- Behravan E, Moallem SA, Khateri S, Maraghi E, Jowsey P, Blain PG, et al. Deoxyribonucleic acid damage in Iranian veterans 25 years after wartime exposure to sulfur mustard. J Res Med Sci Off J Isfahan Univ Med Sci. 2013;18(3):239.
25- Roshanzamir T, Mirkheshti N, Ghassami F, Moghadam NA, Ali S. Bcl-2 Protein Expression in Pulmonary Specimens of Sulfur Mustard Victims. Tanaffos. 2008;7(1):25-31.