• **مقاله تحقیقی**

نمایش اثرات موتاسیون‌زایی گاز خردل و متابولیت‌های آن در مجروحین شیمیایی

فرخنده پوراسماعیلی*

چکیده

مقدمه: خردل گوگردی یکی از عوامل آلکیله کننده‌ای است که مکرراً بر علیه سربازان در جنگ‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. این ماده خطرناک بوده و خسارات فراوان و گاه صدمات جبران ناپذیری بر حیات موجودات زنده وارد آورده است. تاکنون اثرات جهش‌زایی، سرطان‌زایی و تراتوژنیک گاز خردل توسط بسیاری از دانشمندان مورد تحقیق واقع شده است. اما جهش‌زایی خردل گوگردی با متابولیت‌های آن در انسان تقریباً ناشناخته می‌باشد.

روش بررسی: جهت مطالعه اثرات جهش‌زایی گاز خردل و متابولیت‌های آن، نمونه ادرار مجروحین شیمیایی که در معرض گاز خردل قرار گرفته بودند جمع‌آوری گردید و با استفاده از دوآزمون میکروبی بنام‌های تست **Ames** و **Fluctuation(FT)** مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که جهش‌زایی نمونه‌ها را می‌توان با دقت بالا به‌کمک سالمونلا تیفی موریوم تیپ **TA102** اثبات نمود. همچنین این مطالعه اثبات نمود که تست **FT** بسیار حساس‌تر از تست **Ames** بوده و با کاربرد آن می‌توان حضور مقادیر بسیار جزیی موتاژن را نیز به نمایش گذاشت.

کلمات کلیدی : گاز خردل، عوامل آلکیله‌کننده، جهش‌زا، تست Ames، آزمون مقادیر جزیی

مجله علمی ابن سینا / اداره بهداشت و درمان نهاجا (سال دوازدهم، شماره اول، بهار ۱۳۸۸، مسلسل ۳۱)

*دکتری تخصصی ژنتیک و بیولوژی مولکولی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی. تلفن: ۲۲۴۳۹۹۶۰

پست الکترونیک : FPoures@Yahoo.Com

مقدمه

تمام اورگانیسم‌ها از تشکیلاتی بنام سلول بوجود آمده‌اند. اسیدهای نوکلئیک (DNA/RNA) و پروتئین‌ها دو ماکرومولکول بسیار پر اهمیت هر سلول هستند. همانندسازی، الگوبرداری و تنظیم رونویسی اعمال بسیار ویژه مولکول DNA هستند. در صورت هرگونه تغییر ناگهانی در بازها یا در ساختمان DNA جهش بوجود می‌آید که چنانچه تعمیر نشده و ابقاء شود آثار آنرا می‌توان در حیات سلول و نهایتاً در موجود زنده مشاهده نمود [۱،۲]. موتاژن‌های شیمیایی و تشعشعات از عواملی هستند که قادرند در DNA تغییرات ژنتیکی ایجاد کنند و در سیستم تعمیر DNA و بیان ژنی آثار جبران‌ناپذیری داشته باشند [۵-۳]. معمولاً جهش‌ها در دو سطح مطالعه می‌شوند: کروموزوم‌ها و ژن‌ها. جهش‌های تک ژنی در سلول‌های جنسی و سلول‌های سوماتیک به‌صورت‌های غالب (Dominant)، نهفته (Recessive) و یا وابسته به جنس (Sex Linked) قابل بررسی هستند [۶]. برای بررسی مکانیسم نحوه ایجاد جهش‌ها، پروکاریوت‌ها بدلیل سادگی و کوچکی اندازه ژنوم خود بر یوکاریوت‌ها ترجیح داده می‌شوند [۷].

عوامل مداخله‌گر (Intercalating agents) و فلزات از عوامل سرطان‌زا و جهش‌زایی هستند که با DNA از طریق باندهای کووالانت یا غیر آن تعامل ایجاد کرده و ماده ژنتیکی را از خود متأثر می‌کنند. عوامل آلکیله کننده مانند گاز خردل و متابولیت‌های آن نیز از عوامل مداخله‌گری هستند که برای فعالیت خود به القاء کننده نیاز دارند. خردل‌ها به چند گروه تقسیم می‌شوند: ۱) گاز خردل، ۲) خردل نیتروژنی، ۳) کلروآمبوسیل، ۴) خردل فنیل آلانین، ۵) سیکلو فسفامید [۸]. گاز خردل با حالت روغنی، بی‌رنگ، نقطه انجمادی برابر ۱۴ و نقطه جوشی برابر ۲۱۷c̊ با بویی شبیه پیاز یا سیر در غلظت‌های بالا موجب خارش چشم‌ها، خونریزی بینی، خستگی عمومی بدن و درد فراوان، خارش پوست، تاول‌های بزرگ و کوچک در سرتاسر بدن در طول ۲۴ ساعت از تماس فرد با آن می‌شود. مشکلات سیستم تنفسی، ورآمدن پوست همراه با تب در روز دوم و بالاخره مرگ بین روزهای دوم تا هفته چهارم پس از استنشاق گاز خردل [۹] کاهش گلبول‌های سفید خون [۱۰] که شانس ابتلا به ذات الریه و سرطان‌های ریه و گلو را افزایش می‌دهد [۹] و افزایش تبادل ماده ژنتیکی بین کروماتیدهای خواهری (SCE) [۱۱،۱۲] از دیگر علائم قابل توجه گاز خردل هستند. گاز خردل در تشکیل باند کووالانت بین بازهای یک رشته RNA یا DNA و یا بین بازهای دو رشته مختلف یک مولکول DNA [۵] و یا با آلکیلاسیون باند فسفو دی استر موجب شکستن مولکول‌های RNA و DNA می‌شود [۱۴،۱۲].

از دیگر آثار مخرب گاز خردل به تأخیر انداختن همانندسازی در فاز S چرخه سلولی است که موجب تراکم سلولی می‌شود اما چنانچه رپلیکان (واحد همانندسازی) باز باشد، این ماده هیچ تأثیری بر DNA نخواهد داشت [۱۵،۱۶]. گزارشات متعددی دال بر افزایش شانس ابتلا به پنومونی در کارگران کارخانجات تولیدکننده گازهای شیمیایی در اطراف لیورپول انگلستان وجود دارد. این کارگران سرطان‌های گلو و ریه را نیز بیش از جمعیت معمولی نشان داده‌اند. همچنین شانس ابتلای سربازان آمریکایی که در معرض گاز خردل قرار گرفته‌اند به سرطان پانکراس و شانس کارگران ژاپنی سازنده گاز خردل در ابتلا به ناهنجاری‌های تنفسی بیشتر بوده و آمار مرگ و میر در آنها بدلیل اینکه در معرض گاز خردل بوده‌اند قابل توجه می‌باشد [۱۷].

روش بررسی

۳۰ نمونه ادرار از مصدومینی که در معرض گاز خردل قرار داشتند (هر یک ۲۰۰ میلی لیتر) جمع‌آوری گردید، در بطری‌های استریل قرار گرفته و بلافاصله به دمای -20^{c} منتقل گردید. آزمون Ames مطابق مقالات سال‌های ۱۹۷۵ و ۱۹۸۳ [۱۸،۱۹] برای انجام تست‌های باکتریایی مورد استفاده قرار گرفت. گونه‌ای از باکتری سالمونلا تیفی موریوم که فاقد ژن

هیستیدین طبیعی بود انتخاب گردید. این باکتری علاوه بر جهش در اوپران هیستیدین موتاسیون‌های دیگری داشت که در تعیین آثار موتاژن‌های مختلف کارآمد بود از جمله جهش rfa که موجب حذف پلی ساکاریدهای سطح سلولی شده و به ورود بی‌رویه ماکرومولکول‌هایی شبیه بنزوپیرن بداخل سلول کمک می‌کند و جهش UVrB که بدلیل تخریب ژن کد کننده سیستم تعمیر DNA، حساسیت سلول را به موتاژن‌ها بالا می‌برد. باکتری‌های TA102، TA100، TA98، TA97a که همگی حامل پلاسمید مقاومت PKM101 (مقاوم به آمپی‌سیلین) بودند انتخاب شدند. TA102 با سیستم DNA سالم علاوه بر این پلاسمید حامل چندین کپی از سایر پلاسمیدهای مقاومت مثل PAQ1 (دارای ژن His G428 و ژن مقاومت به تتراسایکلین) نیز بود. همه باکتری‌های انتخاب شده به نور ماوراء بنفش حساس بوده (حضور پلاک یا هاله روشن در اطراف رنگ موجود در آگار) و موتاسیون rfa در ژنوم آنها رخ داده است. همه باکتری‌های فوق غیر از TA102 به UV حساس بوده و رشد یا تقسیمی در محیط آگار انتخابی ندارند مگر در جایی که توسط آلومینیوم فویل پوشیده شده و جذب UV در آنجا رخ نمی‌دهد.

آزمون باکتری

هر نمونه باکتری با استفاده از محیط‌های آگار انتخابی مورد آزمون قرار گرفت و هر بار در سطح محیط رشد دو نوع کلنی داشت. یک نوع کلنی متعلق به سلول‌هایی بود که بطور خودبخودی جهش یافته بودند (جدول ۱) و تیپ کلنی‌های دیگر متعلق به سلول‌هایی بود که بخاطر حضور القاء کننده زنده مانده و تشکیل کلنی داده بودند.

جدول ۱- شمارش موتانت های خود بخود

باکتری	تعداد باکتری‌های موتانت
TA98	30 – 50
TA97a	90 – 180
TA100	120 – 200
TA102	240 – 320

تهیه عصاره جگر (S9 mix)

برای ایجاد محیطی مشابه محیط درون موجود زنده، رت‌های ۲۰۰ گرمی از نژاد اسپراگ دالی (Sprague Dolly) نخاعی شده، جگر بطور کامل خارج و به قطعات بسیار ریز خورد گردید سپس قطعات جگر هموژن شده و در 9000g بمدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردیدند. محلول روئی (S9) در ۲۰° – نگهداری شد.

کروماتوگرافی جذبی

(Absorption Chromatography)

جهت جداسازی و تغلیظ ترکیبات نمونه‌های ادرار، از کروماتوگرافی بر روی ستون امبرلایت XAD-2 مطابق تجارب قبلی استفاده شد [۲۲-۲۰]. استون (A)، متانول (M)، کلروفورم (C) و اتانول (E) حلال‌های انتخابی در این سری کروماتوگرافی بودند. هر نمونه ادرار بطور مجزا از ستون‌ها عبور داده شده و سپس با سه نوع حلال شستشو گردید. استخراج‌ها سپس تغلیظ گردیدند.

آزمون جهش‌زائی نمونه‌ها

(Plate Incorporation test)

بر اساس تجارب Ames در سال ۱۹۸۳ [۲۳] مخلوطی از نمونه (عصاره ادرار)، باکتری و عصاره جگرS9 به‌همراه آگارورویی (Top agar) روی محیط کشت انتخابی شد و بمدت ۲ روز در ۳۷° اینکوبه گردید و سپس هر پتری بطور مجزا مطالعه گردید.

آزمون مقادیر جزئی (Fluctuation test, FT)

برای افزایش حساسیت تست‌های جهش‌زایی از آزمون مقادیر جزئی FT [۲۴] استفاده گردید. کشت تازه باکتری، نمونه استخراج شده و مخلوط S9 به محیط کشت مایع افزوده، در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای توزیع و پس از ۳ روز اینکوبیشن، بررسی و مطالعه شدند.

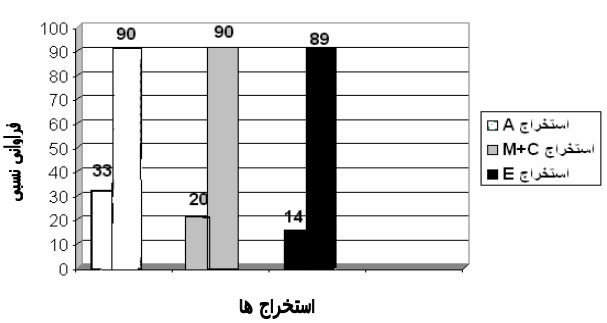
یافته‌ها

تمامی استخراج‌های استون (A) و متانول- کلروفورم (M+C) ۲۰ نمونه ادرار مجروحین انتخاب و با TA100 تست شدند. زمانی‌که آزمون Ames انجام گرفت، بجز یک نمونه، تمام دیگر نمونه‌ها در مقایسه با کنترل منفی (فاقد استخراج ادراری) هیچ گونه جهش‌زایی معنی‌داری نشان ندادند (p<۰/۰۵). زمانی‌که TA98 برای انجام همان تست (Ames) و همان نمونه‌ها استفاده گردید دریافتیم که حساسیت قابل توجهی به نمایش جهش فریم شیفت نمونه‌ها ندارد. بر عکس TA102 حساسیت بسیار بالایی را در نشان دادن جهش‌زایی نمونه‌های ادراری و ترکیبات استخراجی آنها در مقایسه با کنترل منفی بروز داد. این سوش توانست جهش‌زایی معنی دارو تفاوت قابل ملاحظه آنرا بین نمونه ادرای دو گروه کنترل (شاهد) و بیمار (مجروح) نشان دهد(p<۰/۰۰۱).

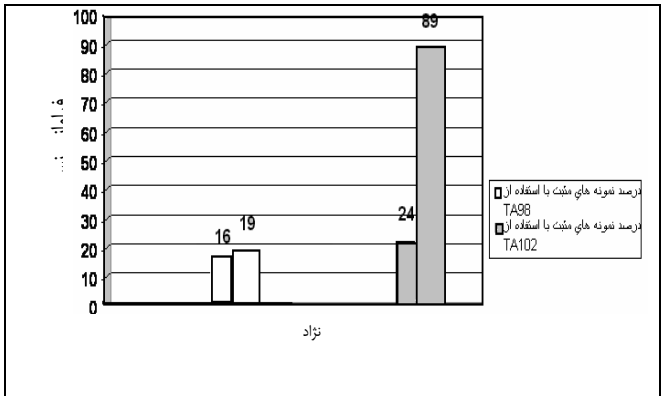
همچنین با استفاده از تست Ames و باکتری TA102 حضور موتاژن‌ها در نمونه‌ها و توانائی آنها در ایجاد جهش از نوع کراس لینک(Cross Linkage) اثبات گردید. در زمان استفاده از تست مقادیر جزئی (FT) و TA102 تعداد بیشتری ازعصاره‌های مورد آمون جهش‌زایی معنی‌دار نشان دادند (p<۰/۰۵). لذا، برای انجام باقی آزمایشات از تست FT و نمونه‌های باکتری TA102 استفاده شد زیرا این دو فاکتور برای نشان دادن مقادیر بسیار پایین موتاژن در نمونه‌های ادراری حتی پس از ۱۵ روز آلودگی بوسیله گاز خردل بهترین فرآیند و حساسیت را نشان می‌دادند (جدول ۲ و نمودار ۱و۲)

جدول ۲- نتایج حاصل از دو تست میکروبی و سه سوش سالمونلا بر روی عصاره‌های ادراری

باکتری	تست Ames		تست . FT		جمع
	ترکیبات موردامتحان	ترکیبات مثبت	ترکیبات موردامتحان	ترکیبات مثبت	ترکیبات مثبت
TA98	61	0	50	3	3
TA100	60	1	-	-	1
TA102	18	4	95	54	58



نمودار ۱: توزیع فراوانی نسبی استخراج نمونه های ادراری مورد آزمون (۲۰ تا ۳۰ میکرولیتر در هر چاهک پلیت چند خانه ای) با استفاده از TA102



نمودار ۲- توزیع فراوانی نسبی استخراج‌های نمونه‌های ادراری مورد آزمون (۲۰ تا ۳۰ میکرومتر در هر چاهک پلیت چند خانه‌ای) براساس باکتری مورد استفاده

بحث و نتیجه‌گیری

خردل گوگردی یکی از عناصر خطرناکی است که بارها در جنگ‌ها علیه مردم نظامی و غیرنظامی مورد استفاده قرار گرفته است. این ماده آثار مخرب بیولوژیک بسیار قوی بر موجودات زنده دارد. جهش‌زایی، سرطان‌زایی و تراتوژن بودن این ماده همواره مورد بحث بوده است [۲۵]. در این سری آزمایشات عصاره‌های مختلف ادرار مصدومین به گاز خردل با استفاده از حلال‌های متفاوت تهیه گردید. تمامی استخراج‌های استون (A) و متانول- کلروفورم (M+C) ۲۰ نمونه ادرار مجروحین با TA100 و آزمون Ames، بجز یک نمونه، در مقایسه با کنترل منفی (فاقد عصاره ادراری) هیچ گونه جهش‌زائی معنی‌داری نشان ندادند (p<۰/۰۵) به‌عبارتی می‌توان چنین

نتیجه گرفت در نمونه‌های مذکور موتاژن خاصی که قادر به ایجاد جایگزینی‌های بازی در ماده ژنتیکی باکتری‌ها شود وجود نداشته است. همچنین با کاربرد TA98 برای انجام Ames و همین نمونه‌ها، حساسیت قابل توجهی در نمایش جهش فریم شیفت نمونه‌ها دیده نشد.

TA102 حساسیت بسیار بالایی را در نشان دادن جهش‌زائی نمونه‌های ادراری و ترکیبات استخراجی آنها در مقایسه با کنترل منفی بروز داد. این سوش توانست جهش‌زائی معنی دارو تفاوت قابل ملاحظه آنرا بین نمونه ادرای دو گروه کنترل (شاهد) و بیمار (مجروح) نشان دهد ($p<۰/۰۰۱$). نتایج این سری از تجارب مؤید آنست که با توجه به اینکه تنها ۲۲٪ از نمونه‌های مورد آزمون در تست Ames و ۲۵٪ آنها در تست FT آثار جهش‌زائی معنی‌دار نشان می‌دهند ($p<۰/۰۵$)، حضور عناصر مستقیم عمل‌کننده در ادرار مجروحین شیمیایی مصدوم به خردل تأیید می‌گردد. زمانی‌که برای انجام تست‌ها از استخراج‌های نمونه‌های ادراری و باکتری نشانگر TA98 استفاده گردید، ۱۶٪ استخراج استون (A)، ۵٪ استخراج اتانول (E) و ۲۰٪ ترکیبات استخراج شده ترکیبی از متانول – اتانول(M+E) جهش‌زائی مثبت نشان دادند (در دوز ۲۰ و ۳۰ میکرولیتر، نمودار ۱) در حالی‌که حدود ۹۰ درصد همین استخراج‌ها با مقدار ۳۰ میکرولیتر در هر پلیت با کاربرد باکتری TA102 بعنوان نشانگر بیولوژیک جهش‌زایی داشتند (نمودار۲). فعالیت ژنتیکی که پس از استفاده از TA102 و اعمال تست FT مشاهده گردید مربوط به وجود مقادیر هیستیدین موجود در استخراج‌های ادرار نبوده است زیرا رزین XAD-2 (فاز جامد کروماتوگرافی) جاذب این اسید آمینه نمی‌باشد. در نتیجه با قاطعیت می‌توان اذعان داشت که هیستیدین موجود در نمونه‌های استخراج ادراری(در صورت عبور از ستون) آنقدر کم بوده است که تأثیری در نرخ برگشت‌پذیری خودبخود باکتری‌ها نداشته است. باید توجه داشت که بعضی داروهای مصرفی یا متابولیت‌های آنها یا ترکیبات حد واسطی که از واکنش آنها با دیگر ترکیبات ادرار بدست می‌آید، شرایط اقلیمی، برنامه غذائی، زمینه وراثتی، فعالیت‌های ورزشی قبلی، عادت به سیگار و سایر عوامل می‌توانسته بر میزان تأثیر گاز خردل یا متابولیت‌های آن اثرگذار بوده باشد. اما بهرحال، دست‌آوردهای این مطالعه پیشنهاد می‌کنند که TA102 بهترین سویه باکتری است که برای نمایش حضور موتاژن‌ها در نمونه‌های ادراری مصدومین به گاز خردل می‌تواند مورد بهره‌گیری قرار گیرد و تست FT بسیار حساس‌تر از Ames بوده و قادر است حضور مقادیر بسیار جزئی موتاژن را نیز تعیین نماید.

References

1. Lodisch H, Ber kA, Zipursky SL et al. Molecular biology, 2nd edn. WH Freeman, London (1999)
2. Lewin B. “Genes” John Wiley and Sons, Inc. (1985)
3. Strachan T, Read a P.Human Molecular Genetics 3rd edn. Garland Science, London and New York (2004)
4. Auerbagh C. A pilgrims Progress through mutation research. 21, NO3, spring, PP.319-334 (1978)
5. Auerbagh C. Mutation Research Problems, Research and perspectives. Chapman and Hall. England (1976)
6. Epstein RJ. Human Molecular Biology: an Introduction to the molecular basis of health and disease: Cambridge University Press, Cambridge (2003)
7. Lewin B. Genes VII, 7th edn. Oxford University Press. Oxford (2000)
8. Ludlum DB. “Alkylating agents and nitrosamines Cancer, Vol V, Plenum Press (1975)

9. World Health Organization Publication. WHO; PP: 1- 22(1974)
10. Budiansky S. United Nation accuses Iraq Military Use. Nature, Vol. 308, PP: 483(1984)
11. Wolf HC, et al. sister chromatid Exchanges in fisherman exposed to leaking mustard gas shells. The Lancet. March 23, PP: 690-69(1985)
12. Huang CC.Retionol (Vitamin A) Inhibition of Dimethyl nitrosamine (DMN) and Diethylnitrosoamine (DEN) induced sister – Chromatid – Exchange in 769 cells and mutations in Salmonella / microsome assay . Mutation Research. 187, pp: 133-140 (1987)
13. Narglson GP and Salfhill R. Carcinogenicity of alkylating agents "Advances in medical Oncology. Vol.II. Oxford: pergamon Press .Ltd (1979)
14. Charles E. Searle. Chemical Carcinogenes"American Chemical Society .PP: 83 – 244(1976)
15. Roberts JJ, et al. The Unique Senility of walker rat tumor cells to dysfunctional Agents is associated with a failure to recover from inhibition of DNA Synthesis and increased chromosome damage. Mutation Research 166, PP: 169-181 (1986)
16. Savage JRK and Breken G. Differential effects of sulfur mustard on S- phase cells of primary fibroblast cultures from Syrian hamster. Mutation Research. 84. PP: 375-387(1981)
17. Michio Yamakido, Shinichi Ishioka, Keiko Hiyama, and Akihiro Maeda. Former poison gas workers and cancer: Incident and inhibition by treatment with biological response modifier N-CWS. Environmental Mutagens, Environmental Health Perspectives 104, Supplement 3, May (1996)
18. Maron DM. and Ames BN. Revised methods for Salmonella mutagenicity test. Mutation Research 113, PP: 173-215 (1983)
19. Mc Cann J., Choi E. Yamasaki E., and Ames BN. Detection Carcinogenes as mutagens the Salmonella microsome Test. Assay of 300 chemicals pro. Nat. Acad. Sci, USA. Vol 72, No 12.PP: 5135-5139(1975 Dec)
20. Yamasaki E. and Ames BN. Concentration of mutagens from urine by absorption with the non polar resin XAD-2: Cigarette Smokers have mutagenic urine. Pro. Natl. Acad. Sci. USA. Vol 14, No.8, PP: 3553- 3559(1977 Aug)
21. Sousa J., et al. Dietary Factors affecting the Urinary mutagenicity assay system. Detection of mutagenic activity in Human following a fried beck meal mutation Research 14, pp.365-374(1985)
22. Aeschbacher HV. and Rush E. Urine – mediated Ames test Interactions. Mutation Research, 103 .pp.127-131(1982)
23. Green MHL., et al .Use of a Simplified Fluctuation test to detect low Levels of mutagens. Mutation Research. 38. PP: 33-42 (1976)
24. Maron DM; and Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research .113.pp: 173 – 215 (1983)
25. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control. Final recommendations for protecting the health and safety against potential adverse effects of long-term exposure to low doses of agents: GA, GB, VX, mustard agent (H, HD, T) and Lewisite (L). Fed Reg 53:8504-8507 (1988).

Effects of Mustard gas and its metabolits Mutagenesis on victims of chemical weapons

*Pour-Esmaeili F

The two major threat classes of chemical weapons are mustard gas and the nerve agents. Mustard was used in World War I, and there is an extensive human database on it. The fact that mustard gas is a carcinogen and readily produces a variety of chronic or persistent effects was not fully appreciated until after the war and following extensive human occupational exposure prior to World War II.

Many of the toxicologic studies and human toxicity estimates for both mustard agents were generated for the purpose of developing chemical agents that would quickly produce maximal casualties in the least sensitive male soldier. We must also consider the effects of chemical agents on civilian populations and the effects of prolonged exposures to relatively low doses. These materials have always been extremely potent and efficacious. Their toxicity has not changed, but our perception of it has.

Mustard gas is one of alkylating agents which has been used against soldiers in wars. This hazardous agent has uncopensable effects on humanbeing and other organisms. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenic effects of this toxic gas has been investigated by many scientists, but still there remained unknown facts about mutagenic effects of sulfur mustard and its metabolites to be solved.

In this study, to find an easy, quick and efficient test to indicate mutagenicity of sulfur mustard and its metabolites, 20 urine samples were collected from injoured patients who were exposed to mustard gas in Sardasht area. Samples were assayed for the presence of mutagens by Ames and Fluctuation tests using bacteria strains salmonella typhymurium TA98, TA100 and TA102. This study showed that salmonella typhymurium TA102 is the best strain to be used for detection of mutagens in urine samples of patients exposed tro mustard gas. It was clearly shown that fluctuation test was much more sensitive test than Ames test in detecting low doses of mutagen.

Key words: Mustard Gas, Alkylating agent ns

*PhD in Genetics and Molecular Biology, Assistant Professor of Shahid Beheshti University of Medical Sciences