

اثر درمانی سیکلوسپورین بر آسیب دیررس ریوی ناشی از گاز خردل در موش

فاطمه قسامی^۱- لیلا انصاری^۲- شهلا موحدی^۳- دکتر نوشین افشار مقدم^۴-
دکتر نوشین میرخشتی^۵- دکتر سید علی علوی^۶

چکیده

زمینه و هدف: در میان عوارض دیررس مصدومین گاز خردل، مشکلات ریوی از جمله برونشیت مزمن و فیبروز ریوی، مهمترین علت ناتوانی بلندمدت در بیماران می‌باشد. سیکلوسپورین دارای اثرات ضد التهابی است و در فیبروز ریوی ناشی از سایر علل کاربرد دارد. بر این اساس و با توجه به نقش تنفس اکسیداتیو در پاتوتئز برونشیت مزمن و فیبروز ریوی، در این مطالعه اثر درمانی داروی مذکور در عوارض دیررس گاز خردل و نقش تنفس اکسیداتیو در روند اثر آن بررسی شد.

روش تحقیق: در این مطالعه تجربی، یک گروه ۶ تایی موش سوری نر، پنج ماه پس از مواجهه با گاز خردل به صورت استنشاقی، سیکلوسپورین دریافت کردند. به دنبال بیهوشی عمیق از موش‌ها نمونه‌گیری و سپس آنالیزهای بیوشیمیایی انجام شد؛ مقدار هیدروکسی پرولین ریه، H_2O_2 و ویتامین C سرم و همچنین شمارش افتراقی درصد سلول‌های التهابی در بافت ریه و درصد فضای آلوئولی آن، گروه شاهد مثبت با شاهد منفی و گروه مورد با شاهد مثبت به روش t-student و Mann-Whitney مقایسه شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار درصد فضای آلوئولی ریه، ارتashاج لنفوسيت‌ها و کاهش مقدار H_2O_2 و ویتامين C در گروه شاهد مثبت بود. تجویز سیکلوسپورین باعث کاهش مقدار هیدروکسی پرولین ریه، کاهش ارتashاج لنفوسيت‌ها و طبیعی شدن مقادیر H_2O_2 و ویتامين C شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به کاهش درصد فضای آلوئولی ریه موش‌ها در گروه شاهد مثبت دو فرضیه مطرح می‌شود: یک رسوب کلائژن و بروز فیبروز ریوی و دیگری ارتashاج سلول‌های التهابی و بروز التهاب مزمن که در واقع مطابق با آسیبهای ناشی از گاز خردل در مصدومان شبیهای است. کاهش H_2O_2 - که می‌تواند به علت کاهش آنزیم سوپراکسیدیسموتاز باشد- و کاهش ویتامين C نشان‌دهنده کاهش دفاع آنتی‌اکسیدانی در سرم موش‌ها است. تجویز سیکلوسپورین با طبیعی کردن دو عامل ذکر شده و به عبارتی کاهش تنفس اکسیداتیو، باعث کاهش هیدروکسی پرولین ریه (شاخص فیبروز) و کاهش ارتashاج لنفوسيت‌ها (شاخص التهاب مزمن بافتی) می‌شود.

واژه‌های کلیدی: گاز خردل؛ تنفس اکسیداتیو؛ سیکلوسپورین؛ عوارض دیررس

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرونی (دوره ۱۳؛ شماره ۱؛ بهار سال ۱۳۸۵)

دريافت: ۸۴/۷/۳۰ اصلاح نهایي: ۸۵/۳/۲۰ پذيرش: ۸۵/۳/۲۳

^۱ دانشجویی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و عضو شرکت تحقیقاتی حکیمان شرق- شهرک علمی و تحقیقاتی اصفهان

^۲ دانشجویی پزشکی

^۳ کارشناس شبیه؛ شرکت تحقیقاتی حکیمان شرق- شهرک علمی و تحقیقاتی اصفهان

^۴ استادیار گروه آموزشی آسیب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

^۵ پزشک؛ عضو شرکت تحقیقاتی حکیمان شرق- شهرک علمی و تحقیقاتی اصفهان

^۶ نویسنده مسؤول؛ پزشک

آدرس: اصفهان- خیابان توحید- خیابان قزلباش- شماره ۵- شهرک علمی، تحقیقاتی اصفهان، شرکت تحقیقاتی حکیمان شرق
تلفن: ۰۳۱۱-۶۶۹۸۵۱۸، نمبر: ۰۳۱۱-۶۶۹۸۵۱۸. پست الکترونیکی: alavi@pharm.mui.ac.ir

مقدمه

تنفسی تحتنی (۷) و پیشروندۀ بودن سیر بیماری (۸)، احتمال دخیل بودن تنش اکسیداتیو و گونه‌های فعال اکسیژن دار و کمبود آنتی اکسیدان‌های دفاعی بدن در مقابل آنها مطرح می‌باشد؛ بنابراین داروهایی که بتوانند از شدت تنش اکسیداتیو بکاهند، در جلوگیری از پیشرفت آسیب و یا درمان عوارض دیررس ریوی مجرموحان می‌توانند مؤثر واقع شوند.

سیکلوسپورین A یک داروی سیتوتوکسیک است که با اثر مستقیم بر سلول‌های T و اثر غیر مستقیم بر سلول‌های B، باعث تضعیف سیستم ایمنی و کاهش التهاب می‌شود (۹)؛ گذشته از آن بر اساس نتایج مطالعات مختلف، سیکلوسپورین در مواردی در درمان فیبروز ریوی ایدیوپاتیک مؤثر بوده است؛ به طوری که بر اساس مطالعه Inase و همکاران، از شعله‌ورشدن مجدد (Re-exacerbation) فیبروز ریوی ایدیوپاتیک جلوگیری می‌کند و شانس بیمار را برای بقای طولانی افزایش می‌دهد (۱۰).

با توجه به اثر سیکلوسپورین بر کاهش التهاب و درمان فیبروز ریوی و با توجه به این که برونشیت مزمن و فیبروز ریوی دو علامت بالینی شایع در آسیب دیررس ریوی ناشی از گاز خردل هستند و با عنایت به نقش احتمالی تنش اکسیداتیو در ایجاد عوارض دیررس گاز خردل، مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر درمانی داروی سیکلوسپورین بر عوارض دیررس ریوی گاز خردل و نقش تنش اکسیداتیو در روند تأثیر آن و پاتوژن آسیب دیررس ناشی از گاز خردل انجام شد.

روش تحقیق

در این مطالعه تجربی، ۲۰ موش سوری نر با وزن ۲۳ ± 2 گرم که از آنها در دمای کنترل شده و چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته و تغذیه با غذای استاندارد نگهداری می‌شد، به مدت ۱۵ دقیقه در معرض 600 mg/m^3 گاز خردل به صورت تنفسی قرار گرفتند. پس از پنج ماه، از ۱۲ موش زنده مانده، یک گروه ۶ تایی به عنوان شاهد مثبت و یک گروه ۶ تایی به عنوان مورد و ۸ موش سوری نر سالم بدون مواجهه با گاز

گاز خردل^{*} اولین بار در سال ۱۸۲۲ توسط Despretz ساخته شد و در جنگ‌های متعددی به عنوان سلاح شیمیایی مورد استفاده قرار گرفت. آخرین استفاده از آن در جنگ عراق با ایران در سالهای ۱۹۸۳ تا ۱۹۸۸ گزارش شده است (۱).

گاز خردل یک ترکیب الکتروفیلیک و الکلیکننده است؛ گروه الکل خود را به پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک سلول‌های زنده و اجزای کمپلمان منتقل می‌کند و سبب ایجاد اتصالات مقاطع در مولکول‌های هدف می‌شود (۳،۲) و به این ترتیب در نهایت منجر به مرگ سلول‌ها می‌گردد (۴). سمیّت گاز خردل بسیار بیشتر از قدرت آن در کشتن مصدومین در مرحله حاد مواجهه است. در واقع بر اساس مطالعات انجام‌شده بر روی مصدومین شیمیایی گاز خردل در جنگ جهانی اول و جنگ ایران و عراق، ۳-۴٪ از افراد در زمان مواجهه فوت کرده‌اند؛ در حالی که تمامی آنها به عوارض مواجهه با سم مبتلا شده‌اند. اندازهایی که در معرض تماس با سم هستند یعنی چشم‌ها، راههای هوایی و پوست بیشترین آسیب را متحمل می‌شوند (۱). این اعضاء، سالها پس از مواجهه با گاز خردل همچنان دچار عوارض ناشی از سم خواهند بود؛ به طوری که در مطالعه Khateri و همکاران بر روی ۳۴۰۰۰ مจروح شیمیایی ایرانی ۲۰-۱۳ سال پس از مواجهه، شایعترین عارضه دیررس مجرموحان به ترتیب در ریه‌ها (۴۲/۵٪)، چشم‌ها (۳۹٪) و پوست (۲۴/۵٪) گزارش شده است (۵).

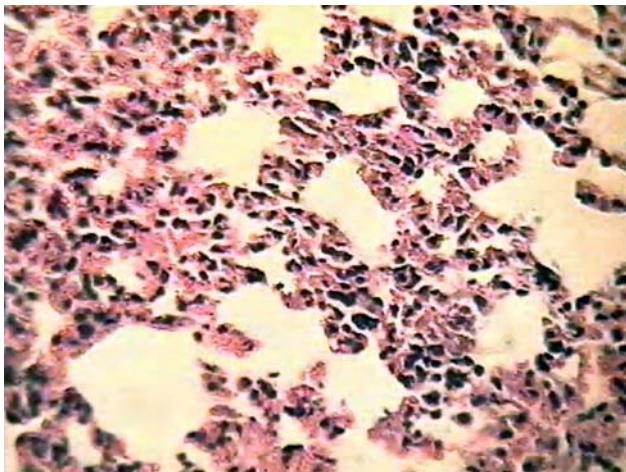
مشکلات ریوی مهمترین علت ناتوانی بلندمدت در مجرموحان شیمیایی گاز خردل است (۱). با این وجود متأسفانه در حال حاضر هیچ برنامه درمانی برای آسیب‌های ریوی ناشی از گاز خردل وجود ندارد.

از سوی دیگر با توجه به نقش اثبات شده تنش اکسیداتیو در پاتوژن التهاب بافتی (۶)، در آسیب دیررس ناشی از گاز خردل نیز با توجه به پایدار بودن فرایند التهاب در مجاری

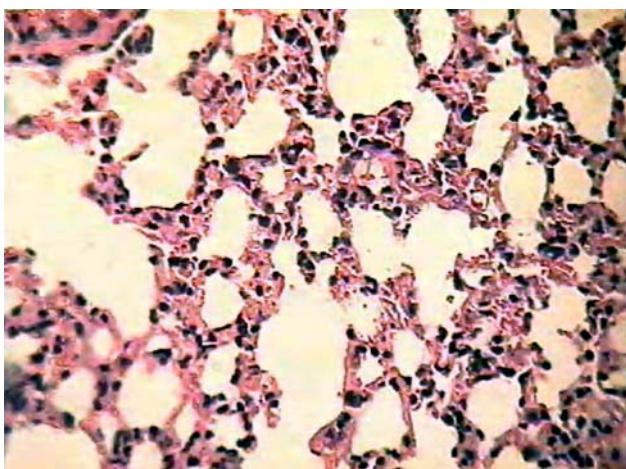
* Sulfur Mustard

لتفوسيتى در گروه شاهد مثبت (شکل ۱) در مقایسه با نمونه‌های سالم (شکل ۲)، افزایش یافته بود. مقدار هیدروکسی پرولین بافت ریه افزایش یافته بود؛ همچنین مقادیر H_2O_2 و ویتامین C در سرم موش‌های شاهد مثبت کمتر از نمونه‌های سالم بود.

مقادیر هیدروکسی پرولین در گروه مورد، نسبت به گروه شاهد مثبت کاهش یافته بود (شکل ۳)؛ همچنین درصد فضای آلوئولی افزایش و ارتشاح لتفوسيتها کاهش یافته بود؛ اين تفاوتها از نظر آماری معنی‌دار نبود؛ همچنین مقادير اين تفاوتها از نظر آماری معنی‌دار نبود؛ همچنین مقادير H_2O_2 و ویتامين C نسبت به گروه شاهد مثبت افزایش یافته بود؛ البته به حدّی که با گروه شاهد منفی تفاوت معنی‌داری را نشان نداد.



شکل ۱- نمای بافتی ریه شاهد مثبت



شکل ۲- نمای بافتی ریه شاهد منفی

خردل به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شدند. در گروه مورد، در سه روز اول سیکلوسپورین با دوز $20 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ در سه روز بعدی با دوز نصف به صورت تزریق داخل صفاقی تجویز گردید. پس از گذشت یک هفته از قطع دارو، از موش‌ها تحت بیهوشی عمیق، نمونه خون گرفته شد. ریه راست برای تهییه مقاطع میکروسکوپی و ریه چپ برای بررسی محتوای هیدروکسی پرولین برداشته شد. ریه چپ موش‌ها برای خشک شدن به مدت ۶ ساعت در دمای 90°C قرار داده شد و سپس تو زین گردید. برای هیدرولیز کلائز، ریه‌ها در اسید کلریدریک ۶ نرمال و دمای 110°C به مدت ۱۲ ساعت قرار داده شدند و به روش Woessner مقدار هیدروکسی پرولین آنها تعیین گردید (۱۱). پس از انجام مراحل آماده‌سازی بافت و تهییه برش از ریه موش‌ها و رنگ‌آمیزی H&E، با استفاده از برنامه رایانه‌ای Matlab درصد فضای آلوئولی آنها تعیین شد. علاوه بر آن لام‌های تهییه شده، توسط متخصص آسیب‌شناسی بررسی و شمارش افتراقی سلول‌های التهابی در بافت ریه انجام شد. در نمونه‌های سرم موش‌ها، اندازه‌گیری H_2O_2 به روش Wolff (۱۲) و ویتامین C به روش Roe و Kuether (۱۳) انجام گردید.

پیروی داده‌ها از توزیع نرمال با استفاده از آزمون آماری کولموگروف- اسمیرنوف، بررسی شد. بر این اساس برای مقایسه متغیرهایی که از توزیع نرمال پیروی می‌کردند، از آزمون آماری t-student و برای سایر موارد از آزمون غیرپارامتری Mann-Whitney در سطح معنی‌داری $P \leq 0.05$ استفاده شد.

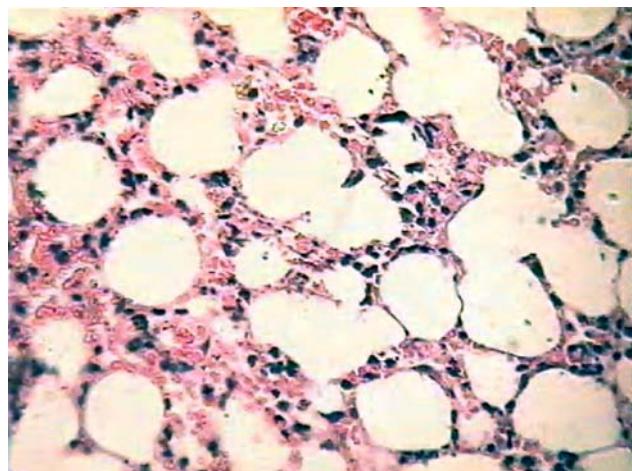
یافته‌ها

بر اساس نتایج حاصل از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف، برای برآورد نرمال‌بودن توزیع داده‌ها، تنها هیدروکسی پرولین از توزیع نرمال پیروی نمی‌کرد.

درصد فضای آلوئولی کاهش و ارتشاح سلول‌های

مقادیر میانگین و انحراف معیار درصد فضای آلوئولی، هیدروکسی پرولین به ازای واحد وزن ریه، درصد ارتashان لنفوسيت‌ها در مقایسه با سایر سلول‌های التهابی، غلظت سرمی H_2O_2 و ویتامین C در گروههای مختلف در جدول ۱، ارائه شده است.

سطح معنی‌داری شاخصهای درصد فضای آلوئولی، هیدروکسی پرولین به ازای واحد وزن ریه، درصد ارتashان لنفوسيت‌ها در مقایسه با سایر سلول‌های التهابی، غلظت سرمی H_2O_2 و ویتامین C بین گروههای مختلف در جدول ۲ ارائه شده است.



شکل ۳- نمای بافتی ریه موش دارو گرفته

جدول ۱- میانگین و انحراف معیار درصد فضای آلوئولی، هیدروکسی پرولین به ازای واحد وزن ریه، درصد ارتashان لنفوسيت‌ها در مقایسه با سایر سلول‌های التهابی، غلظت سرمی H_2O_2 و ویتامین C در گروههای مختلف

مورد	شاهد مثبت	شاهد منفی	گروه	
			شاخص	
۵۸/۹۱±۳/۸۴	۵۶/۹۶±۳/۰۰	۶۰/۴۰±۱/۷۶	درصد فضای آلوئولی هیدروکسی پرولین ریه (mg/g)	
۵±۱/۱۹	۷/۵۰±۱/۰۸	۶/۶۸±۰/۴۲		
۵/۲±۳/۴	۱۲±۵/۷	۴/۸±۲/۱۷		درصد ارتashان لنفوسيت‌ها در مقایسه با سایر سلول‌های التهابی
۱۷/۲±۱/۸۵	۸/۰۱±۳/۰۸	۱۲/۸۲±۳/۸۸		H_2O_2 (μm)
۴۱/۱۶±۳/۴۰	۱۶/۸۴±۲/۹۵	۳۴/۲۵±۱۷/۳۷		ویتامین C (mg/dL)

جدول ۲- سطح معنی‌دار شاخصهای درصد فضای آلوئولی، هیدروکسی پرولین به ازای واحد وزن ریه، درصد ارتashان لنفوسيت‌ها در مقایسه با سایر سلول‌های التهابی، غلظت سرمی H_2O_2 و ویتامین C بین گروههای مختلف

مورد	سطح معنی‌داری			گروه	
	شاهد مثبت و مثبت	شاهد منفی و مثبت	کولموگروف- اسمیرنوف	شاخص	
-	.۰/۰۲۶	.۰/۲۶۵	درصد فضای آلوئولی هیدروکسی پرولین ریه (mg/g)	درصد فضای آلوئولی	
.۰/۰۵	.۰/۰۱	.۰/۰۲۳		هیدروکسی پرولین ریه (mg/g)	
-	.۰/۰۴۳	-		درصد ارتashان لنفوسيت‌ها در مقایسه با سایر سلول‌های التهابی	
.۰/۰۰۰	.۰/۰۰۰	.۰/۷۷۸		H_2O_2 (μm)	
.۰/۰۰۱	.۰/۰۰۰	.۰/۰۶۴		ویتامین C (mg/dL)	

بحث

مشکلات ریوی مهمترین علت ناتوانی بلندمدت مجموعه حاضر نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار درصد فضای آلوئولی در گروه شاهد مثبت (دريافت‌کننده گاز خردل) نسبت به گروه شاهد منفی می‌باشد که می‌تواند به دو علت باشد؛ اول ارتashان سلول‌های التهابی و دوم افزایش کلاژن بافتی و ايجاد فيبروز. در مطالعه حاضر در نمونه‌های پاتولوژی (۵۸٪)، فيبروز ریوی (۱۲٪)، آسم (۱۰٪)، باريک‌شدن راههای

مواجهه‌یافته با گاز خردل، منجر به کاهش معنی‌دار مقدار هیدروکسی پرولین ریه موش‌ها و کاهش غیرمعنی‌دار ارتضاح لنفوسيت‌ها و همچنین افزایش معنی‌دار مقادیر H_2O_2 و ویتامين C سرم شد؛ به حدی که مقادیر H_2O_2 و ویتامين C با نمونه‌های سالم تفاوت معنی‌داری را نشان نداد؛ بنابراین می‌توان گفت که سیکلوسپورین علاوه بر اثر ضد فیروزی، ممکن است دارای اثرات ضد التهابی باشد. بر اساس نتایج مطالعه Siwik و همکاران، H_2O_2 باعث کاهش سنتز کلائز فیبریلار در فیبروبلاست‌های قلب می‌شود (۲۱)؛ به این ترتیب می‌توان علت کاهش محتوای هیدروکسی پرولین ریه موش‌ها را ناشی از افزایش H_2O_2 دانست.

فرضیه دیگر نقش لنفوسيت‌های T در فرایند ایجاد فیروز می‌باشد. نتایج مطالعه Sendelbach و همکاران نشان‌دهنده این مطلب است که لنفوسيت‌های T در روند ایجاد فیروز ناشی از Butylated Hydroxytoluen، بلئومایسین و برلیوم مؤثر می‌باشند (۲۲) و سیکلوسپورین A با حذف پاسخهای التهابی مربوط به لنفوسيت‌های T باعث کاهش محتوای هیدروکسی پرولین ریه می‌شود. در این میان باز هم می‌توان نقش H_2O_2 را به عنوان واسطه عملکرد سیکلوسپورین مطرح نمود. برای اثبات این فرضیه به انجام مطالعات بیشتری نیاز است.

همسویی تغییرات ویتامین C و H_2O_2 در مطالعات متعددی مشاهده شده است؛ به عنوان مثال در مطالعه Mendiratta و همکاران، در گلوبول‌های قرمز اسیداسکوربیک افزایش وابسته به دوز در میزان پراکسید هیدروژن درون سلولی می‌دهد (۲۳) و یا تزریق صفاقی ویتامین C به خرگوش، مقدار H_2O_2 زلالیه چشم آن را افزایش می‌دهد (۲۴).

نکته قابل ذکر دیگر آن که مطالعات پیشین نشان‌دهنده اثر داروی مذکور در ایجاد تنفس اکسیداتیو است (۲۷-۲۵) که منجر به ایجاد عوارض ناخوشایند آن می‌گردد اما در مطالعه حاضر غلظت H_2O_2 تفاوت معنی‌داری با گروه سالم نداشت؛

بررسی شده، ارتضاح لنفوسيت‌ها افزایش یافته بود. علاوه بر آن با این که اختلاف معنی‌داری در مورد تفاوت محتوای هیدروکسی پرولین در واحد وزن ریه به دست نیامد، در گروه شاهد مثبت، افزایش قابل توجهی نسبت به گروه شاهد منفی مشاهده شد. نتایج حاصل دال بر بروز التهاب مزم می‌باشد.

همزمان بر خلاف انتظار مقدار H_2O_2 سرم موش‌های شاهد مثبت، کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه سالم نشان داد. با توجه به این که پراکسید هیدروژن از طریق واکنش دیسموتاسیون توسط آنزیم سوپراکسیدیسموتاز (SOD) تولید می‌شود (۱۵)، کاهش مقدار H_2O_2 را می‌توان ناشی از کمبود و یا نقص عملکرد آنزیم سوپراکسید دیسموتاز دانست که منجر به بالا رفتن غلظت آبیون سوپراکسیدیسموتاز که مهمترین عامل سمیّت اکسیژن در بدن است (۱۶)، می‌شود.

در مطالعه Husain و همکاران، مواجهه حاد با گاز خردل، منجر به کاهش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در گلوبول‌های سفید، پلاکت‌ها، سلول‌های طحال و مغز استخوان در مدل حیوانی شد (۱۷)؛ در مطالعه دیگری تجویز داخل صفاقی سوپراکسید دیسموتاز قبل از ایجاد زخم‌های پوستی، به صورت فوق العاده‌ای، وسعت منطقه سوختگی در اثر گاز خردل را کاهش داد (۱۸)؛ البته نتیجه مطالعه Buezynski و Gnitecki بر خلاف موارد فوق، افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز را در سلول‌های پلاکت پس از مواجهه In-vitro با گاز خردل نشان داد (۱۹). با توجه به فرضیه مطرح شده پیشنهاد می‌گردد در مطالعات بعدی مقادیر سوپراکسید دیسموتاز و رادیکال سوپراکسید سرم در مدل دیررس عوارض ناشی از گاز خردل اندازه‌گیری شود؛ به این ترتیب افزایش تنفس اکسیداتیو باعث کاهش فرم احیا ویتامین C می‌گردد که در نتایج نیز مشاهده می‌شود و از آنجا که ویتامين C مهمترین ماده آنتی‌اکسیدان موجود در راههای هوایی است (۲۰)، کمبود آن آثار مخرب قابل توجهی می‌تواند داشته باشد. در این مطالعه، تجویز سیکلوسپورین در موش‌های

برای بررسی دقیقتر این مطلب پیشنهاد می‌شود که در مطالعات آینده مقادیر سوپراکسید دیسموتاز و رادیکال‌های هیدروکسیل و سوپراکسید پس از مواجهه با گاز خردل و بعد از درمان با داروی مذکور اندازه‌گیری گردد.

یعنی تولید آن به حدّی که بتواند منجر به عوارض دارویی گردد، افزایش نیافته بود.

نتیجه‌گیری

گاز خردل در آسیب دیررس خود نیز منجر به افزایش تنش اکسیداتیو می‌گردد و در مقابل سیکلوسپورین از شدت تنش اکسیداتیو ناشی از گاز خردل کاسته و از این طریق اثرات درمانی خود را ظاهر می‌سازد.

منابع:

- 1- Balali-Mood M, Hefazi M. The pharmacology, toxicology, and medical treatment of sulfur mustard poisoning. Fundam Clin Pharmacol. 2005; 19 (3): 297-315.
- 2- Papirmeister B, Feister AJ, Robinson SI, Ford RD. Medical defense against mustard gas: toxic mechanism and pharmacological implications. USA: CRC Press; 1991.
- 3- Mieer HL, Millard CB. Alterations in human lymphocyte DNA caused by sulfur mustard can be mitigated by selective inhibitors of poly (ADP-ribose) Polymerase. Biochim Biophys Acta 1998; 1404: 367-76.
- 4- Moser J, Meier HL. Comparison of cell in sulfur mustard- induced death of keratocytes and lymphocytes. J Appl Toxicol 2000; 1:23-30.
- 5- 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): 1136-43.
- 6- Mitchell RN, Cotran RC. Cell injury, adaptation and death. In: Kumar V, Cotran R, Robbins SL. Robbins basic pathology. 7th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2003.
- 7- Emad A., Rezaian GR. Immunoglobulins and cellular constituents of the BAL fluid of patients with sulphur mustard gas-induced pulmonary fibrosis. Chest. 1999; (115): 1346–51.
- 8- Aghanouri R, Ghanei M, Aslani J, Keivani-Amine H, Rastegar F, Karkhane A. Fibrogenic cytokine levels in bronchoalveolar lavage aspirates 15 years after exposure to sulfur mustard. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2004; 287 (6): 1160-64.
- 9- Wierda D, Sauers LJ. Immunomodulating drugs In: Craig CR, Stitzel RE. Modern pharmacology. 4th ed. Boston: Little & Brown; 1994.
- 10- Inase N, Sawada M, Ohtani Y, Miyake S, Isogai S, Sakashita H, et al. Cyclosporin A followed by the treatment of acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis with corticosteroid. Int Med. 2003; 42 (7): 565-70.
- 11- Woessner J. The determination angiotensin II of hydroxyproline in tissue and protein samples containing SM all proportion of this imino acid. Arch Biochem Biophys. 1961; 93: 440-47.
- 12- Wolff SP. Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measure of hydroperoxides. In: Packer L. Methods in enzymology. Vol.233, Part C. San Diego: Academic Press; 1994.
- 13- Roe JH, Kuether CA. The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative of dehydroascorbic acid. J Biol Chem. 1943; 147:399-407.
- 14- Emad A., Rezaian GR. The diversity of effects of sulphur mustard gas inhalation on respiratory system 10 years after a single heavy exposure: analysis of 197 cases. Chest. 1997; 112: 734-38.
- 15- Mayes PA, Botham KM. Biologic oxidation. In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper's illustrated biochemistry. 26th ed. New York: McGraw-Hill; 2003.

- 16- Li Y, Yan Q, Pendergrass WR, Wolf NS. Response of lens epithelial cells to hydrogen peroxide stress and the protective effect of caloric restriction. *Exp Cell Res.* 1998; 239 (2): 254-63.
- 17- Husain K, Dube SN, Sugendran K, Singh R, Das Gupta S, Somani SM. Effect of topically applied sulphur mustard on antioxidant enzymes in blood cells and body tissues of rats. *J Appl Toxicol.* 1996; 16(3):245-48.
- 18- Eldad A, Ben Meir P, Breiterman S, Chaouat M, Shafran A, Ben-Bassat H. Superoxide dismutase (SOD) for mustard gas burns. *Burns.* 1998; 24 (2): 114-19.
- 19- Buczynski A, Gnitecki W. Effect of mustard gas on superoxide dismutase activity and the level of malonyl dialdehyde: in-vitro studies. *Int J Occup Med Environ Health.* 1999; 12 (2): 119-22.
- 20- Hatch GE. Asthma, inhaled oxidants, and dietary antioxidants. *Am J Clin Nutr.* 1995; 61 (3 Suppl):625S-630S.
- 21- Siwik DA, Pagano PJ, Colucci WS. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001; 280 (1): C53-60.
- 22- Sendelbach LE, Lindenschmidt RC, Witschi HP. The effect of cyclosporin A on pulmonary fibrosis induced by butylated hydroxytoluene, bleomycin and beryllium sulfate. *Toxicol Lett.* 1985; 26 (2-3): 169-73.
- 23- Mendiratta S, Qu Z, May JM. Erythrocyte defenses against hydrogen peroxide: the role of ascorbic acid. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1380 (3):389-95.
- 24- Giblin FJ, McCready JP, Kodama T, Reddy VN. A direct correlation between the levels of ascorbic acid and H_2O_2 in aqueous humor. *Exp Eye Res.* 1984; 38 (1): 87-93.
- 25- Krauskopf A, Buetler TM, Nguyen NS, Mace K, Ruegg UT. Cyclosporin A-induced free radical generation is not mediated by cytochrome P-450. *Br J Pharmacol.* 2002; 135: 977-86.
- 26- Nguyen NS, Cottet-Maire F, Buetler TM, Lo Russo A, Krauskopf AS, Armstrong JM, et al. Metabolism -dependent stimulation of reactive oxygen species and DNA synthesis by cyclosporin A in rat smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27 (11-12): 1267-75.
- 27- Hong F, Lee J, Song JW, Lee SJ, Ahn H, Cho JJ, et al. Cyclosporin A blocks muscle differentiation by inducing oxidative stress and inhibiting the peptidyl-prolyl-cis-trans isomerase activity of cyclophilin A: cyclophilin A protects myoblasts from cyclosporin A-induced cytotoxicity. *FASEB J.* 2002; 16 (12): 1633-35.

Therapeutic effect of cyclosporine on delayed pulmonary complication due to mustard gas in mice

F. Ghassami¹, L. Ansari¹, Sh. Moradi²; N. Afshar Moghaddam³,
N. Mirkheshti⁴, SA. Alavi⁵

Abstract

Background and Aim: Among late complications in mustard gas or sulfur mustard (SM) casualties, respiratory problems, especially chronic bronchitis and pulmonary fibrosis are the greatest causes of long-term disability. Cyclosporine has anti-inflammatory effects and is used in other pulmonary fibroses due to other factors. Thus, with respect to the role of oxidative stress in the pathogenesis of chronic bronchitis and pulmonary fibrosis, the therapeutic effects of Cyclosporine on delayed complications of mustard gas and the role of oxidative stress in the procedure were studied.

Materials and Methods: In this experimental study, a group of six male mice received cyclosporine after five months of inhaling mustard gas. After killing the mice and obtaining tissue samples, biochemical analyses of hydroxyproline of lung, H₂O₂, vitamin C of serum, and also alveolar space percentage and inflammatory cell infiltration, the comparison between positive and negative control and also between case and positive control was performed.

Results: Results indicated a significant decrease in alveolar space percent, lymphocyte infiltration, H₂O₂, and vitamin C in the positive control group. Cyclosporine administration decreased lung hydroxyproline and lymphocyte infiltration; and normalized H₂O₂ and vitamin C.

Conclusion: Decrease of pulmonary alveolar space of the mice brings up two hypotheses. First: collagen precipitation and incidence of pulmonary fibrosis. Second: inflammatory cell infiltration and incidence of chronic inflammation that is corresponding to SM induced lung injury in chemical casualties. Decrease of H₂O₂-that can be due to decrease of superoxide dismutase- and vitamin C, demonstrates decrease of antioxidant defense in the serum of the mice. Cyclosporine administration effects by normalizing these two agents-; i.e decreasing oxidative stress- induces a decrease in lung hydroxyproline (index of fibrosis) and lymphocyte infiltration (index of chronic tissue inflammation).

Key Words: Mustard gas; Oxidative stress; Cyclosporine; Delayed complications

¹ Student of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences. Isfahan, Iran.

² B.Sc in Chemistry

³ Assistant Professor, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences. Isfahan, Iran.

⁴ Physician

⁵ Corresponding Author; Physician. alavi@pharm.mui.ac.ir