اثرات گاز کلر بر سیکل سلولی و محتوی DNA گلبول‌های سفید موش سوری

*مینو شهیدی I

دکتر منیژه متولیان II

چکیده

زمینه و هدف: تاکنون گاز کلر به عنوان یک عامل تحریکی برای غشاهای موکوسی و لوله‌های تنفسی شناخته شده است و می‌تواند سبب افزایش رادیکال‌های آزاد گردد. رادیکال‌های آزاد موجب تخریب سلولی می‌گردند. هدف از این مطالعه اندازه‌گیری محتوی DNA و سیکل سلولی در گلبول‌های سفید خون پس از مسمومیت با گاز کلر می‌باشد.

روش بررسی: این مطالعه که از نوع تجربی در محیط آزمایشگاه است، بر روی هشتاد موش نر(چهل موش به عنوان نمونه و چهل موش به عنوان کنترل) انجام گرفت. اولین گروه نمونه در طی سه هفته مورد مسمومیت قرار گرفتند و سپس نمونه خون آن‌ها جمع‌آوری گردید. سیکل سلولی و محتوی DNA به وسیله تکنیک فلوسیتومتری ارزیابی شد.

یافته‌ها: بررسی نشان داد که گاز کلر بر سیکل سلولی و محتوی DNA گلبول‌های سفید موش‌های سوری تاثیر گذاشته و سبب تغییر در فازهای سلولی شده است به طوری که بر فاز G0G1 اثر کاهنده و بر G2M و S اثر فزاینده داشته است($P<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: به عنوان نتیجه کلی کلر بر روی سیکل سلولی و محتوی DNA گلبول‌های سفید به طور معنی‌داری اثر داشته و به نظر می‌رسد که مانند یک ماده میتوژن عمل کند.

کلیدواژه‌ها: ۱ – مسمومیت با گاز کلر ۲ – سیکل سلولی ۳ – موش سوری ۴ – محتوی دی . ان . آ

تاریخ دریافت: ۸۳/۷/۲۶، تاریخ پذیرش: ۸٤/۲/۱۰

مقدمه

عنصر کلر یکی از عناصری است که در سال ۱۷۷٤ توسط شئل کشف گردید. گازی است بدون رنگ تا زرد متمایل به سبز که بوی مخصوص و محرک دارد. این عنصر در زمره عناصری است که در ارتباط تنگاتنگ با زندگی بشر است.

هر چند در سال ۱۹۱۵ از آن به عنوان یک گاز شیمیایی در خلال جنگ جهانی اول استفاده گردید لیکن این گاز امروزه تسهیلات بسیاری برای انسان فراهم کرده است، از جمله موارد استفاده فراوان آن در ضد عفونی کردن آب آشامیدنی فاضلاب و آب استخرها است.

I) کارشناس ارشد هماتولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران، تهران.(*مولف مسؤول)

II) استادیار و Ph.D. فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران، تهران.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-03-30]

علاوه بر آن در صنعت به وفور از آن استفاده می‌گردد.[۱] طبق پژوهش‌های انجام شده، مصرف بسیار شایع گاز کلر در ضد اعصاب مرکزی و دستگاه تولید مثل دارد.[۲،۳] پژوهش دیگری اثرات سرطان‌زای آب کلردار را نشان داده است.[٤] از طرفی عده‌ای از محققین نشان داده‌اند که این گاز در زمره عوامل مسمومیت‌زای شغلی است.[۵]

بر طبق تحقیقات انجام شده استفاده نامتناسب از گاز کلر در ضدعفونی آب استخرهای شنا و عدم رعایت اصول مصرف، خطرات بسیاری را به خصوص در استخرهای سرپوشیده که تهویه مناسب ندارند به دنبال دارد[۶،۷] و در بعضی تولید آسم می‌نماید.[۸]

با توجه به عوارض مختلف گاز کلر و با توجه به نتایج مطالعات عده‌ای از محققین که سرطان‌زایی متوسط آن را بر رده سلولی انسانی نشان داده‌اند[۹] و نتایج بررسی‌های دیگری که اثرات سیتوتوکسیک ترکیبات کلردار بر لنفوسیت‌های خون محیطی و سلول‌های کلیه موش رات را بررسی نموده‌اند[۱۰]، هدف اصلی این پژوهش بررسی تاثیر گاز کلر استنشاقی بر سیکل سلولی گلبول‌های سفید خون است. چرا که یکی از مهم‌ترین عوارضی که به طور معمول به دنبال مسمومیت با گازهای شیمیایی و در دراز مدت در افراد مشاهده می‌گردد عوارض خونی آن‌ها می‌باشد.

در حالت طبیعی سیکل سلولی به پنج مرحله تقسیم می‌شود و در هیستوگرام DNA حاصل از آنالیز فلوسیتومتر مراحل آن مشخص می‌گردد. تغییرات این مراحل در سلول‌های حیوانات مسموم نسبت به شاهد، نشانگر موثر بودن گاز کلر بر سیکل سلول و محتوی DNA است که می‌تواند مقدمه‌ای برای ایجاد بدخیمی باشد.

روش بررسی

در این مطالعه که از نوع تجربی در محیط آزمایشگاه است از موش سوری به عنوان جامعه پژوهش استفاده گردید، روش نمونه‌گیری، غیراحتمالی آسان و حجم نمونه ۸۰ موش سوری در نظر گرفته شد، چهل موش به عنوان نمونه و چهل موش به عنوان کنترل مورد بررسی قرار گرفتند.

این تحقیق هم زمان در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی و آزمایشگاه گروه فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران و به مدت ۱۰ ماه به انجام رسیده است. دستگاه مورد استفاده فلوسیتومتر سیستم بکتون دیکنسون موجود در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران بود، این سیستم هم به منظور کارهای معمول کلینیکی و هم جهت تحقیقات پیشرفته طراحی شده است و با کامپیوتر مکینتاش همراه است، برای آنالیز DNA از نرم‌افزارهای Cell quest TM و Modifit استفاده گردید.

برای بررسی سیکل سلولی از کیت DNAcon3 که از محصولات شرکت داکو می‌باشد استفاده گردید. این کیت برای استفاده با فلوسیتومتر طراحی شده است و برای اندازه‌گیری پلوئیدی و محتوی DNA به کار می‌رود. لوله‌های تست آن هر یک حاوی مخلوط بافر لیوفیلیزه RNAse برای حذف مزاحمت RNA و ثابت کننده کروماتین می‌باشند، علاوه بر آن محلول پروپیدم آیودایدِ(PI) که یک رنگ فلورنس است و به طور اختصاصی با DNA باند می‌شود جهت محلول نمودن بافر ذکر شده در کیت به کار می‌رود.

تهیه گاز کلر: از روش‌های متعددی برای تهیه گاز کلر می‌توان استفاده نمود، در این مطالعه از واکنش پرمنگنات پتاسیم براسید کلریدریک طبق فرمول زیر گاز تهیه گردید.

$$KMNO_4+8HCL \rightarrow 5/2Cl_2+MnCL_2+4H_2O$$

در این مطالعه از ۸۰ موش سوری استفاده گردید که ٤۰ موش به عنوان شاهد نرمال بوده و گاز کلر دریافت ننموده‌اند و ٤۰ موش دیگر مسموم گردیدند. مسموم‌سازی حیوانات در آزمایشگاه فارماکولوژی انجام شد به طوری که پس از تأثیر دادن میزان خاصی از اسید کلریدریک بر میزان مشخص از پرمنگنات پتاسیم، گاز کلر تهیه شده به درون

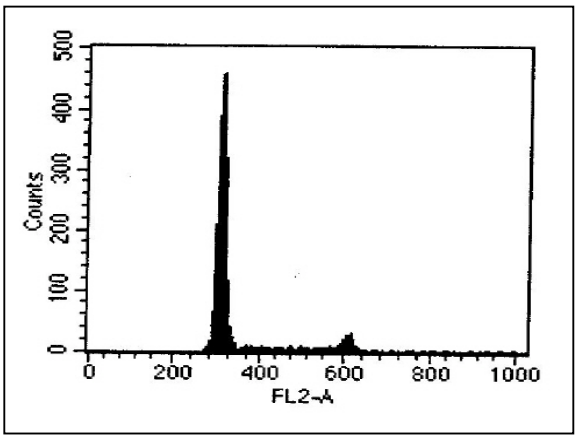
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-03-30]

محفظه لاکی که حیوانات در گروه‌های ٤ تایی در آن قرار داشتند هدایت می‌شد.

پس از انجام آزمایش‌های اولیه مدت زمان مطالعه اثر کلر بر روی حیوان به نحوی که حیوان از بین نرود، یک دقیقه تعیین گردید. حیوانات سه بار در هفته و به میزان یک دقیقه در هر بار در معرض گاز کلر قرار می‌گرفتند و در هفته سوم نمونه خون از آن‌ها تهیه می‌شد.

خون‌گیری از دم موش‌های سوری صورت گرفت و نمونه طبق روش کیت آنالیز DNA محصول شرکت داکو بر روی ضد انعقاد سیترات سدیم جمع‌آوری می‌شد و بلافاصله به مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، قسمت فلوسیتومتری منتقل شده، بررسی سیکل سلولی بر روی آن انجام می‌گردید.

تکرار رشد و تقسیم سلولی و یا سیکل سلولی به پنج مرحله تقسیم می‌شود و در هیستوگرام DNA حاصل از آنالیز به توسط فلوسیتومتر مشخص می‌گردد(تصویر شماره ۱). سلول‌های G0 و G1 در اولین پیک هیستوگرام جا دارند و در حالت طبیعی نماینده اکثر جمعیت سلولی قبل از همانندسازی DNA می‌باشند. پیک دوم شامل G2 و سلول‌های در حال میتوز(M) می‌باشد. سلول‌های فاز S بین G0G1 و G2M قرار دارند و همانندسازی DNA در این فاز انجام می‌شود. تعداد سلول‌های فاز S نشان دهنده پتانسیل تکثیری نمونه آنالیز شده می‌باشد و در پروگنوز و درمان حایز اهمیت است. در این پژوهش جهت محاسبات آماری از نرم‌افزار کامپیوتری SPSS و برای مقایسه داده‌ها از آزمون T-Student استفاده گردید.



تصویر شماره ۱- هیستوگرام DNA و مراحل سیکل سلولی را نشان می‌دهد.

یافته‌ها

در جدول شماره ۱ ملاحظه می‌شود که متغیرهای G0G1، G2M و S در هر دو گروه مسموم و کنترل دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد($p<۰/۰۵$)، این موضوع بیانگر آن است که گاز کلر بر سیکل سلولی گلبول‌های سفید موش‌های مورد آزمایش تاثیر گذاشته است، به طوری که بر متغیر G0G1 اثر کاهنده و بر متغیرهای G2M و S اثر فزاینده داشته است.

در مورد تغییر DI(اندیکس DNA) که نشان دهنده محتوی DNA می باشد و از تقسیم محتوی DNA سلول‌های نمونه بر محتوی DNA سلول‌های رفرنس حاصل می‌گردد. همچنین در هر دو گروه اختلاف معنی‌دار می‌باشد($p<۰/۰۵$) به طوری که در گروه مسموم افزایش نشان می‌دهد.

جدول شماره ۱- متغیرها و شاخص‌های آن‌ها را در دو گروه مورد و کنترل نشان می‌دهد

متغیر	گروه‌ها / شاخص‌ها	تعداد نمونه‌ها	میانگین	انحراف معیار	نتیجه آزمون آماری
G0G1	کنترل	٤٠	٩٩/٠٥	٠/٥٢	t=٣/٩٤٥
	مورد	٤٠	٨٨/٣١	١٧/٢١	P<٠/٠٠٠١
G2M	کنترل	٤٠	٠/٤٣	٠/٣٥	t=٤/٨٢٧
	مورد	٤٠	١/٣٠	١/٠٧	P<٠/٠٠٠١
S	کنترل	٤٠	٠/٤٩	٠/٣٢	t=٣/٧٩٦
	مورد	٤٠	٨/٩	١٤/١٥	P<٠/٠٠١

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-03-30]

بحث

در قسمت نتایج ذکر گردید که اثر گاز کلر بر هر یک از مراحل سیکل سلول معنی‌دار بود، به طوری که سلول‌های G0G1 در گروه مسموم به طرز قابل توجهی کاهش یافته و حاکی از آن است که سلول‌های این فاز به فازهای بعدی سیکل سلول وارد شده‌اند و گاز کلر محرک این تغییر فاز بوده است.

در بررسی فاز S گروه مسموم با اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل افزایش نشان می‌دهند. این به این معنی است که گلبول‌های سفید خون که بیش‌تر آن‌ها را لنفوسیت‌ها تشکیل می‌دهند، شروع به سنتز DNA نموده و از فرم دیپلوئید خود به فرم تتراپلوئید مبدل می‌شوند، در بررسی فاز G2M نیز نتایج در گروه مسموم نسبت به گروه کنترل به طرز معنی‌دار($P<۰/۰۵$) افزایش نشان می‌داد. این افزایش به معنی وارد شدن سلول در فاز میتوز است.

برطبق نتایج گذشتگان گاز کلری که به منظور از بین بردن باکتری‌ها به آب آشامیدنی اضافه گردیده در ترکیب با مواد ارگانیک، کلروفرم، تری‌هالومتان(THMS) و ترکیبات فرعی دیگری تولید می‌کند که به شکل قوی با سرطان در ارتباط می‌باشند و می‌توانند شانس ابتلا به سرطان مثانه را ١٤ تا ١٦ برابر افزایش دهند، این محققین معتقدند که این ترکیبات فرعی با سقط جنین‌های خودبه‌خود، نقص‌های نوزادان و مشکلات تنفسی مرتبط می‌باشد.

در سال ۱۹۹۲ در آمریکا ۲۸ درصد سرطان‌های روده و ۱۸ درصد سرطان‌های مثانه به مصرف آب کلردار نسبت داده شد و شانس ابتلا مردانی که آب کلردار می‌نوشند نسبت به افرادی که آب بدون کلر مصرف می‌کنند دو برابر اعلام گردید.[۳]

محققین دیگری اثرات سرطان‌زایی آب کلردار را در کانادا مورد بحث قرار داده‌اند و معتقدند که هر چند کلر اثر حفاظتی قوی در برابر خطرات میکروبی دارد لیکن از سوی دیگر پتانسیل سرطان‌زایی نیز دارد می‌باشد که از قبل مورد انتظار نبوده و این پتانسیل توسط ترکیبات تولید شده در آب ایجاد می‌شود.[٤] محققین دیگری اثرات ۳-کلرو٤-دیکلرومتیل٥-هیدروکسی۲-فورانون را بر لنفوسیت‌های خون محیطی و سلول‌های کلیه رات بررسی کرده و تغییرات سیتوژنتیک را در این سلول‌ها گزارش کرده‌اند.[۱۰] همچنین تحقیقات دیگری اثرات تخریبی کلر را بر DNA نشان داده است و به نظر می‌رسد که این اثرات تخریبی در نتیجه تولید رادیکال‌های آزاد باشد.[۱۱]

نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر در ادامه تحقیقات گذشته می‌تواند هشداری جدی در مصارف بی‌رویه و بدون کنترل کلر و ترکیبات آن، چه در آب آشامیدنی و چه به منظور ضدعفونی مواد مختلف و در استخرهای سرپوشیده و مصارف صنعتی باشد. به طوری که تأکید می‌شود کلر موجود در آب استخرها از یک تا چهار قسمت در میلیون (ppm) فراتر نرود و بهتر است از استخرهای روباز برای شنا استفاده گردد.[۸]

محدودیت‌های پژوهش: با توجه به نتایج مطالعه، به نظر می‌رسد که گاز کلر قابلیت نفوذ و تأثیر بر سیکل سلول‌های خون و خصوصاً گلبول‌های سفید را دارا است. این در حالی است که معمولاً در مسمومیت استنشاقی به دلیل مسایل و مشکلات تنفسی و ریوی که زودتر از عوارض خونی دست می‌دهد احتمال تلف شدن حیوان بسیار زیاد است و این محدودیت را در انجام آزمایش ایجاد می‌نماید که قبل از ظهور علایم و تاثیرات خونی حیوان به دلیل ضایعات شدید ریوی که قبلاً اشاره شد از بین برود. در انجام مطالعه حاضر بارها این مشکل پدید می‌آید که به این ترتیب تعدادی از نمونه‌ها با وجود داشتن علایم مسمومیت شدید حذف می‌شدند.

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان دهنده این است که مسمومیت با گاز کلر گلبول‌های سفید موش سوری را وادار به میتوز نموده و در واقع می‌تواند به عنوان یک عامل موثر بر تکثیر گلبول‌های سفید تلقی شود. به عبارتی اگر چه نمی‌توان گاز کلر را با قاطعیت به عنوان یک ماده سرطان‌زا معرفی نمود ولی حداقل به عنوان یک ماده میتوژن می‌توان

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-03-30]

به حساب آورد، لیکن برای اثبات سرطان‌زا بودن آن نیاز به تحقیقات وسیع‌تری می‌باشد.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با استفاده از حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران در قالب طرح تحقیقاتی(شماره ثبت: ٤٩٨) انجام گردیده است و نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسوولین آن مرکز ابراز می‌دارند.

منابع

1- Winder C. The toxicology of Chlorine. Environ-Res; 2001. 85(2): 105-14.

2- Leo F Paris. When experience challenges received wisdom: The case of drinking water. Journal of Environmental Health Denver; 2001. 64 lss. 4: 36.

3- Michacl Downey. Trouble on tap. Better Nutritin. Atlanta; 2002. 64, lss. 6: 32.

4- S Michelle Dridger, John Eyles. Communicating about chlorinated drinking water and cancer in the media. Social Science & Medicine. Oxford; 2003. 56, lss. 6: 12.

5- Barbee S, Stone I, Hilasks R. Acute toxicology of oxalyl chloride' American Industrial; akron; 1995. (56): 74-77.

6- Brain P Emanuel. The relationship between pool water quality and evntilation. Journal of Environmental Health; Denver; 1998: 17-20.

7- Anonymous. Chlorine and Asthma. Journal of physical education, Recreation & Dance. Reston; Nov 2004, 75, p: 5-7.

8- Selene Yeager. Is chlorine taking your breath. Prevention. Emmaus; 2004. 56, lss. 12: 39.

9- Woodruff NW, Purant JL, Donhoffner LL, Penman BW, Crespi CL. Human cell mutagenicity of chlorinated and unchlorinated water and the disinfection byproduct 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanon(MX). Mutat Res; 2001. 22, 22. 445(1-2): 157-168.

10- Aki Paakkanen J, Jansson K. Cytogenetic effects in the peripheral lymphocytes and kidney cells of rats exposed to 3-chloto-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(furanone(MX) orally on three consecutive days. Division of environmental Health, National Public Health Institute, Finland. Mutat Res; 1995. 343(2-3): 151-6.

11- Hallinell B. Oxygen and nitrogen are Pro-carcinogens. Damag to DNA by reactive oxygen, Chlorine and…. Matal-Res; 1999. 15, 443(1-2): 37-52.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-03-30]

The Effects of Chlorine on Cell Cycle and DNA Content of WBC in Mice

*M. Shahidi, MSc[I] M. Motevalian, Ph.D.[II]

Abstract

Background & Aim: Chlorine has been known as a mucus membranes and respiratory tract irritant. This gas can increase free radicals which cause cell damage. The aim of the present study was to measure DNA content and cell cycle in white blood cells after chronic chlorine poisoning.

Materials & Methods: A clinical experimental study was carried out on 80 male mice(40 mice as sample and 40 as control). The first group was affected by chlorine during 3 weeks and then their blood samples were obtained. Cell cycle and DNA content were measured by flowcytometry.

Results: The collected data showed that G0G1, G2M, S phase and DNA index changed significantly in two groups. G0G1 phase decreased and G2M and S phase increased($P<0.05$).

Conclusion: In conclusion chlorine can significantly affect cell cycle and DNA content and seems to act as a mitogen.

Key Words: 1) Chlorine Poisoning 2) Cell Cycle 3) Mice 4) DNA Content

*I) MSc in Hematology. School of Paramedicine. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran. (*Corresponding Author)*
II) Assistant Professor of Pharmacology. School of Medicine. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-03-30]