

Mitochondrial/Lysosomal Protective and Antioxidant Agents Reduce Toxicity Induced by Toluene in Human Lymphocytes

Seydi E^{1,2}, Pourahmad J³, Shoja Talatappe B³, Salimi A^{*4,5}

1. Department of Occupational Health and Safety Engineering, School of Health, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

2. Research Center for Health, Safety and Environment, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

3. Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4. Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy, Ardabil University of Medical Science, Ardabil, Iran

5. Traditional Medicine and Hydrotherapy Research Center, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran.

* *Corresponding author.* Tel: +98453352-3833, Fax: +984533522197, E-mail: salimikd@yahoo.com
a.salimi@pharmacy.arums.ac.ir

Received: Jun 21, 2020 Accepted: Nov 20, 2020

ABSTRACT

Background & objectives: Toluene as a systemic toxin and industrial solvents has different effects on vital organs of the body. There is little mechanistic study of the interactions between toluene and human lymphocytes. In this study, the direct toxicity of toluene and the potential of agents with antioxidant, mitochondrial/lysosomal protective effects to reduce its possible toxicity in human lymphocytes were studied.

Methods: Blood lymphocytes were isolated from healthy male volunteer's blood, using Ficoll Paque Plus followed by gradient centrifugation. In this study, cell viability, reactive oxygen species (ROS) level, lipid peroxidation (LPO), mitochondrial membrane potential (MMP), lysosomal membrane damage, glutathione (GSH) and glutathione disulfide (GSSG) levels, were determined in blood lymphocytes after incubation with toluene and antioxidant, mitochondrial and lysosomal protective compounds.

Results: Results showed that toluene reduced lymphocyte viability, increased ROS levels, LPO content, damage to lysosomal membranes, mitochondrial damages and GSH depletion, which these damages were significantly inhibited by dibutyl hydroxytoluene (BHT) as a synthetic antioxidant, cyclosporine A (Cs. A) as an inhibitor of mitochondrial pores, and chloroquine as a lysosomotropic agent.

Conclusion: Results of our study suggest that using of antioxidants, mitochondrial and lysosomal protective agents can be effective in reducing toluene-induced toxicity in exposed individuals.

Keywords: Toluene; Antioxidant; Cytotoxicity; Mitochondria; Mitochondrial Protective Agents

عوامل محافظت کننده میتوکندریایی / لیزوزومی و آنتی اکسیدانی سبب کاهش سمیت ناشی از تولوئن در لنفوسیت‌های انسانی می‌شوند

عنایت اله صیدی^{۱،۲}، جلال پوراحمد^۳، بهناز شجاع طلائی^۳، احمد سلیمی^{۴،۵}*

۱. گروه مهندسی بهداشت حرفه ای و ایمنی کار، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران.

۲. مرکز تحقیقات بهداشت، ایمنی و محیط (HSE)، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران.

۳. گروه فارماکولوژی و توکسیکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۴. گروه فارماکولوژی و توکسیکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران.

۵. مرکز تحقیقات طب سنتی و آب درمانی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران.

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۵۳۳۵۲۲۴۳۷ فاکس: ۰۴۵۳۳۵۲۲۱۹۷ پست الکترونیک: a.salimi@pharmacy.arums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: تولوئن به عنوان یک سم سیستمیک و حلال صنعتی دارای اثرات مختلفی بر روی ارگان‌های حیاتی بدن می‌باشد. مطالعات مکانیستیک اندکی در ارتباط با فعل و انفعالات بین تولوئن و لنفوسیت‌های انسانی وجود دارد. در این مطالعه سمیت مستقیم تولوئن و پتانسیل ترکیبات با خواص آنتی اکسیدانی و محافظتی در مقابل آسیب‌های میتوکندریایی و لیزوزومی به منظور کاهش سمیت احتمالی آن در لنفوسیت‌های انسانی مورد مطالعه قرار گرفت.

روش کار: لنفوسیت‌های انسانی از افراد داوطلب مرد با استفاده از Ficoll Paque Plus و به دنبال آن سانتریفیوژ کردن‌های مختلف جداسازی شدند. در این مطالعه، پارامترهایی از قبیل زنده ماندن سلولی، سطح رادیکال‌های فعال (ROS)، لیپید پراکسیداسیون، سقوط پتانسیل غشای میتوکندری (MMP)، آسیب لیزوزومی، سطح گلوتاتیون احیا (GSH) و اکسیده (GSSG) در لنفوسیت‌های انسانی پس از مواجهه با تولوئن و ترکیبات آنتی اکسیدان و محافظت کننده میتوکندری و لیزوزومی مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تولوئن سبب کاهش در زنده ماندن لنفوسیت‌ها، افزایش سطح ROS، لیپید پراکسیداسیون، آسیب به غشای لیزوزوم، میتوکندری و تخلیه گلوتاتیون شده است که این آسیب‌ها توسط عوامل چون دی‌بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) به عنوان یک آنتی اکسیدان مصنوعی، سیلکوسپورین (Cs.A) به عنوان مهارکننده روزه‌های میتوکندریایی و کلروکین به عنوان محافظت کننده لیزوزومی به طور معنی داری مهار شد.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه پیشنهاد می‌کند که استفاده از آنتی اکسیدان‌ها و عوامل محافظت کننده میتوکندریایی و لیزوزومی می‌تواند در کاهش سمیت ناشی از تولوئن در افراد مواجهه یافته موثر باشد.

واژه‌های کلیدی: تولوئن، آنتی اکسیدان، سمیت سلولی، میتوکندری، محافظت کننده‌های میتوکندریایی

دریافت: ۱۳۹۹/۴/۱ پذیرش: ۱۳۹۹/۸/۳۰

مقدمه

حلال‌های آلی به گروهی از مواد شیمیایی اطلاق می‌شود که به طور گسترده در فرایندهای صنعتی مورد استفاده قرار می‌گیرند و دارای خصوصیتی

از جمله فراریت بالا و حلالیت در چربی می‌باشند [۱]. تولوئن یک هیدروکربن آلی و پرکاربردترین حلال صنعتی است که در ساخت رنگ‌ها، ناخن‌ها، براق کننده‌های کفش، جوهرها و حلال رنگ‌ها کاربرد

دارد. علاوه بر این، در صنایع آرایشی بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد و همچنین از اجزای نایلون‌ها و بطری‌های پلاستیکی است [۳،۲]. کاربرد گسترده تولوئن در فرایندهای صنعتی مختلف باعث شده است که تعداد زیادی از کارگران در معرض بخارات آن قرار بگیرند [۴]. مواجهه با تولوئن معمولاً از طریق استنشاق بخار آن صورت می‌گیرد، اما مواجهه با آن از طریق تماس پوستی، مخاطی و خوراکی نیز امکان‌پذیر است [۴]. با توجه به اثرات سمی خطرناک ناشی از تولوئن^۱ ACGIH حد آستانه مجاز میانگین تراکم زمانی ppm ۲۰ در طی ۸ ساعت کار را برای تولوئن پیشنهاد کرده است [۵]. تولوئن می‌تواند بر سیستم‌های حیاتی بدن از جمله سیستم ریوی، سیستم اعصاب مرکزی و محیطی، سیستم‌های خونی، قلبی، کلیوی، پوستی و کبدی اثر بگذارد [۸-۶].

تحقیقات نشان داده است که مواجهه با تولوئن باعث افزایش استرس اکسیداتیو در موش‌های صحرایی شده است [۱۰،۹]. علاوه بر این، مواجهه مزمن و طولانی مدت با تولوئن باعث افزایش مولکول‌های پرو-اکسیداتیو و کاهش مارکرهای آنتی‌اکسیدانی شده است [۱۲،۱۱]. شواهدی تحقیقاتی وجود دارد که تولوئن بخشی از سمیت خود را از طریق استرس اکسیداتیو (بواسطه افزایش رادیکال‌های آزاد و لیپید پراکسیداسیون) انجام می‌دهد [۱۱]. استرس اکسیداتیو یک عدم تعادل بین سیستم‌های اکسیداتیو و آنتی‌اکسیداتیو در سلول‌ها و بافت‌ها و نتیجه تولید فعال اکسیژن (ROS) می‌باشد [۱۵-۱۳]. زنجیره انتقال الکترون در میتو‌کندری مهمترین منبع تولید ROS در سلول‌ها می‌باشد [۱۷،۱۶]. افزایش بیش از حد ROS باعث آسیب به ماکرومولکول‌های بدن (پروتئین‌ها، چربی‌ها و لیپیدها) می‌شود [۱۹،۱۸]. در برخی مطالعات گذشته اثرات تولوئن بر لئوسیت‌های خون

انسانی مورد بررسی قرار گرفته است [۲۱،۲۰]. اما تا به اکنون مکانیسم‌های سلولی دخیل در اثرات تولوئن بر لئوسیت‌های خون انسانی به طور دقیق مورد بررسی قرار نگرفته است. بنابراین، در این مطالعه هدف بررسی سمیت مستقیم تولوئن و ارزیابی پتانسیل ترکیبات با خواص آنتی‌اکسیدانی، محافظتی در مقابل آسیب‌های میتو‌کندریایی و لیزوزومی به‌منظور کاهش سمیت احتمالی آن در لئوسیت‌های انسانی است.

روش کار

نمونه‌های خون

تمام نمونه‌های خون (۱۰ نفر) از آزمایشگاه مسعود (تهران، ایران) تهیه و از نظر سلامتی توسط سازمان انتقال خون (تهران، ایران) مورد تأیید قرار گرفتند. این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تأیید شده است و همه افراد سالم فرم رضایت نامه آگاهانه را امضا کرده اند [۲۲].

جداسازی لئوسیت‌ها

لئوسیت‌ها از نمونه خون ۱۰ داوطلب سالم در محدوده سنی بین ۲۵ تا ۳۵ سال جمع‌آوری شدند. لئوسیت‌ها با استفاده از Ficoll Paque Plus و سانتریفیوژ کردن در دور $g \times 2500$ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد جداسازی شدند. لئوسیت‌ها در بافر لیز کننده اریتروسیت‌ها (150 میلی مولار NH_4Cl ، 10 میلی مولار $NaHCO_3$ ، 1 میلی مولار EDTA در $pH=7.4$) معلق شدند و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس PBS بلافاصله اضافه شد و سلول‌ها دور $g \times 1500$ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. محلول رویی دور ریخته شد و سلول‌ها با محیط کشت RPMI1640 و L-گلوتامین و FBS (۱۰٪) دو بار شستشو داده شدند و در دور $g \times 200$ به مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ شدند. غلظت نهایی لئوسیت‌ها در

¹ American Conference of Governmental Industrial Hygienists

مطالعه 1×10^6 cells/ml بود. بیش از ۹۵ درصد سلول‌ها در زمان انجام تست‌ها زنده بودند [۲۳].

سنجش زنده مانی سلولی

آزمایش MTT یکی از روش‌های رنگ سنجی متداول برای بررسی میزان سمیت مواد بر حیات سلول است. این مساله با سنجش قدرت احیاء رنگ تترازولیوم (MTT) توسط آنزیم‌های سلولی و تبدیل آن به بلورهای فورمازان با رنگ بنفش مورد بررسی قرار می‌گیرد. لئوسیت‌ها (1×10^4 cells/ml) در پلیت ۹۶ تایی در حضور تولوئن (۰/۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ v/v %) و عدم حضور تولوئن (گروه کنترل) برای ۶ ساعت مواجهه داده شدند. در پایان مواجهه، ۲۵ میکرولیتر از MTT (۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر در RPMI1640) به هر کدام از چاهک‌های پلیت اضافه و انکوباسیون به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. سپس کریستال‌های فورمازان نامحلول در DMSO حل شدند. در نهایت جذب توسط ELISA Reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد [۲۳].

سنجش تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن (ROS)

جهت ارزیابی سطح ROS بواسطه مواجهه با تولوئن از معرف DCFH-DA استفاده شد. معرف DCFH-DA پس از نفوذ به لئوسیت‌ها به دی کلروفلورسین (DCFH) غیرفلورسنت هیدرولیز می‌شود. سپس در اثر واکنش با ROS به دی کلروفلورسین (DCF) با فلورسنت بالا تبدیل می‌شود. به طور خلاصه، لئوسیت‌ها در پلیت‌های ۲۴ تایی (10^6 سلول در میلی‌لیتر) در RPMI1640 با L-گلوتامین و ۱۰٪ FBS در ۳۷ درجه سانتیگراد با ۵٪ CO_2 و رطوبت مناسب به مدت ۳ ساعت انکوبه شدند. لئوسیت‌ها با DMSO (۰/۰۵٪) به عنوان گروه کنترل، غلظت‌های مختلف تولوئن (۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۵۰۰۰ نانوگرم/لیتر) در گروه‌های مجزا و تولوئن (۱۰۰۰ نانوگرم/لیتر) + BHT (۵۰ میکرو مولار) و H_2O_2 به عنوان کنترل مثبت مواجهه در ۳۷ درجه سانتیگراد تحت درمان

قرار گرفتند. سپس در طول ۳ ساعت (هر ساعت یکبار) میزان تولید رادیکال‌های فعال اندازه‌گیری شد. در پایان هر ساعت، لئوسیت‌ها با PBS شسته و در PBS حاوی ۱۰ میکرومول DCF-DA به مدت ۱۵ دقیقه معلق شدند. به منظور حذف رنگ اضافی لئوسیت‌ها که قبلاً با DCF-DA رنگ آمیزی شده بودند با ۱ دقیقه سانتریفیوژ در ۱۰۰۰ دور در دقیقه از محیط جدا شدند دو بار با استفاده از PBS شستشو داده شدند. سپس شدت فلورسانس DCF با استفاده از اسپکتوفتومتر فلورسانس Shimadzu RF5000U (طول موج جذبی و نشری ۵۰۰ و ۵۲۰ نانومتر، به ترتیب) اندازه‌گیری شد [۲۲].

سنجش لیپید پراکسیداسیون

مالون دی آلدئید (MDA) به عنوان محصول جانبی پراکسیداسیون لیپید در نمونه با اسید تیوباریتوریک (TBA) واکنش داده و یک ترکیب اضافی MDA-TBA تولید می‌کند. ترکیب اضافی MDA-TBA را می‌توان به راحتی در ۵۳۲ نانومتر از نظر کالریتری تعیین کرد. لئوسیت‌ها در پلیت‌های ۲۴ تایی (10^6 سلول در میلی‌لیتر) در RPMI1640 با L-گلوتامین و ۱۰٪ FBS در ۳۷ درجه سانتیگراد با ۵٪ CO_2 و رطوبت مناسب به مدت ۳ ساعت انکوبه شدند. لئوسیت‌ها با DMSO (۰/۰۵٪) به عنوان گروه کنترل، غلظت‌های مختلف تولوئن (۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۵۰۰۰ نانوگرم/لیتر) در گروه‌های مجزا، تولوئن (۱۰۰۰ نانوگرم/لیتر) + BHT (۵۰ میکرو مولار)، تولوئن (۱۰۰۰ نانوگرم/لیتر) + Cs.A (۵ میکرو مولار) و تولوئن (۱۰۰۰ نانوگرم/لیتر) در ۳۷ درجه سانتیگراد تحت درمان قرار گرفتند. پس از مواجهه، لئوسیت‌ها با PBS شسته شدند و محیط کشت حذف شد. سپس توسط هموژنایزر در لوله حاوی ۱ میلی‌لیتر اسید تری کلرواستیک به صورت مکانیکی لیز شدند. نمونه‌های همگن در ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع رویی به لوله جدید حاوی ۴ میلی‌لیتر معرف (حاوی ۲۰ درصد TCA و

۰/۵ درصد TBA) منتقل شدند. این مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد انکوبه شد و پس از خنک شدن سریع با یخ، مخلوط در ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. جذب در ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد [۲۴].

سنجش آسیب میتوکندریایی

معرف رودامین ۱۲۳ (۵ میکرومولار) به عنوان یک رنگ فلورسنت کاتیونی جهت سنجش آسیب میتوکندریایی در لئوسیت‌ها مورد استفاده قرار گرفت. لئوسیت‌ها در پلیت‌های ۲۴ تایی (۱۰^۶ سلول در میلی لیتر) در RPMI1640 با L-گلوتامین و ۱۰٪ FBS در ۳۷ درجه سانتیگراد با ۵٪ CO₂ و رطوبت مناسب به مدت ۳ ساعت انکوبه شدند. لئوسیت‌ها با DMSO (۰/۰۵٪) به عنوان گروه کنترل، غلظت‌های مختلف تولوئن (۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۵۰۰۰ نانوگرم/لیتر) در گروه‌های مجزا، تولوئن (۱۰۰۰ نانوگرم/لیتر) + BHT (۵۰ میکرومولار)، تولوئن (۱۰۰۰ نانوگرم/لیتر) + Cs.A (۵ میکرومولار) و تولوئن (۱۰۰۰ نانوگرم/لیتر) + در ۳۷ درجه سانتیگراد تحت درمان قرار گرفتند. سپس در طول ۳ ساعت (هر ساعت یکبار) میزان شدت فلورسانس رودامین ۱۲۳ اندازه‌گیری شد. در پایان هر ساعت، لئوسیت‌ها با PBS شسته و در PBS حاوی ۵ میکرومول رودامین ۱۲۳ به مدت ۱۵ دقیقه معلق شدند. لئوسیت‌ها که قبلاً با رودامین ۱۲۳ رنگ آمیزی شده بودند با ۱ دقیقه سانتریفیوژ در ۱۰۰۰ دور در دقیقه از محیط جدا شدند. این کار به منظور حذف رودامین ۱۲۳ اضافی از محیط دو بار با استفاده از PBS انجام شد. سپس شدت فلورسانس رودامین ۱۲۳ با استفاده از اسپکتروفتومتر فلورسانس Shimadzu RF5000U در طول موج‌های نشری و جذبی ۴۹۰ و ۵۲۰ مورد سنجش شد [۲۴].

سنجش آسیب‌های لیزوزومی

از رنگ آکریدین اورنج برای اندازه‌گیری بی‌ثباتی غشای لیزوزومی استفاده شد. آکریدین اورنج، یک باز

ضعیف لیزوزوموتروپیک است و بعد از پذیرش پروتون در لیزوزوم به دام افتاده و تجمع می‌یابد که در صورت آسیب لیزوزومی با باز نشر آن سبب افزایش شدت فلورسانس آکریدین اورنج می‌شود. لئوسیت‌ها در پلیت‌های ۲۴ تایی (۱۰^۶ سلول در میلی لیتر) در RPMI1640 با L-گلوتامین و ۱۰٪ FBS در ۳۷ درجه سانتیگراد با ۵٪ CO₂ و رطوبت مناسب به مدت ۳ ساعت انکوبه شدند. لئوسیت‌ها با DMSO (۰/۰۵٪) به عنوان گروه کنترل، غلظت‌های مختلف تولوئن (۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۵۰۰۰ نانوگرم/لیتر) در گروه‌های مجزا، تولوئن (۱۰۰۰ نانوگرم/لیتر) + BHT (۵۰ میکرومولار)، تولوئن (۱۰۰۰ نانوگرم/لیتر) + Cs.A (۵ میکرومولار) و تولوئن (۱۰۰۰ نانوگرم/لیتر) + در ۳۷ درجه سانتیگراد تحت درمان قرار گرفتند. سپس در طول ۳ ساعت (هر ساعت یکبار) میزان شدت فلورسانس آکریدین اورنج اندازه‌گیری شد. در پایان هر ساعت، لئوسیت‌ها با PBS شسته و در PBS حاوی ۵ میکرومول آکریدین اورنج به مدت ۱۵ دقیقه معلق شدند. لئوسیت‌ها که قبلاً با رودامین ۱۲۳ رنگ آمیزی شده بودند با ۱ دقیقه سانتریفیوژ در ۱۰۰۰ دور در دقیقه از محیط جدا شدند. این کار به منظور حذف آکریدین اورنج اضافی از محیط دو بار با استفاده از PBS انجام شد. سپس شدت فلورسانس آکریدین اورنج با استفاده از اسپکتروفتومتر فلورسانس Shimadzu RF5000U در طول موج‌های نشری و جذبی ۴۹۰ و ۵۲۰ مورد سنجش شد [۲۴].

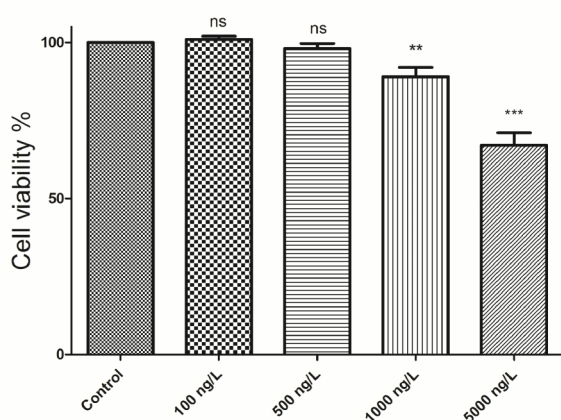
سنجش گلوکاتایون احیا (GSH) و گلوکاتایون اکسید (GSSG)

سطح GSH و GSSG در لئوسیت‌ها تحت درمان با روش Hissin و Hilf اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه، لئوسیت‌ها در پلیت‌های ۲۴ تایی (۱۰^۶ سلول در میلی لیتر) در RPMI1640 با L-گلوتامین و ۱۰٪ FBS در ۳۷ درجه سانتیگراد با ۵٪ CO₂ و رطوبت مناسب به مدت ۳ ساعت انکوبه شدند. لئوسیت‌ها با

یافته‌ها

سمیت سلولی

جهت بررسی اثرات تولوئن بر بقای لنفوسیت‌ها از غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۵۰۰۰ نانوگرم/لیتر استفاده شد. نتایج نشان داد که تولوئن به طور معنی‌داری ($p < 0.05$) بقای لنفوسیت‌ها را در طی ۶ ساعت انکوباسیون در غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۵۰۰۰ نانوگرم/لیتر کاهش داده است. در حالیکه در غلظت ۱۰۰ و ۵۰۰ نانوگرم/لیتر این اثر مشاهده نشد (شکل ۱).



شکل ۱. زنده مانی سلولی

داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده اند (تعداد نمونه‌ها=۵). ** ($p < 0.001$) و *** ($p < 0.001$) نشان دهنده سطح معنی‌داری با گروه کنترل است.

رادیکال‌های فعال اکسیژن

نتایج ارزیابی رادیکال‌های فعال اکسیژن نشان داد که سطح این رادیکال‌ها در لنفوسیت‌ها بعد از مواجهه با تولوئن به طور معنی‌داری در غلظت‌های ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۵۰۰۰ نانوگرم/لیتر و در فواصل زمانی ۱، ۲ و ۳ ساعت افزایش یافته است (شکل ۲). همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است BHT به عنوان یک آنتی‌اکسیدان به طور معنی‌داری سطح رادیکال‌های فعال اکسیژن افزایش یافته ناشی از تولوئن (۱۰۰۰ نانوگرم/لیتر) را کاهش داده است. همچنین، H_2O_2 به عنوان کنترل مثبت برای ارزیابی سطح رادیکال‌های

DMSO (۰.۵٪) به عنوان گروه کنترل، غلظت‌های مختلف تولوئن (۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۵۰۰۰ نانوگرم/لیتر) در گروه‌های مجزا، تولوئن (۱۰۰۰ نانوگرم/لیتر) + BHT (۵۰ میکرومولار)، تولوئن (۱۰۰۰ نانوگرم/لیتر) + Cs.A (۵ میکرومولار) و تولوئن (۱۰۰۰ نانوگرم/لیتر) + در ۳۷ درجه سانتیگراد تحت درمان قرار گرفتند. پس از انکوباسیون، لنفوسیت‌ها دو بار با PBS شسته و توسط هموژنایزر در لوله حاوی ۱ میلی لیتر از بافر فسفات ۰.۱mM به صورت مکانیکی لیز شدند. محلول لیز در ۸۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی جمع آوری شد. برای ارزیابی GSH، ۱۰۰ میکرولیتر مایع رویی با ۳ میلی لیتر از TRIS-HCl ۵۰۰ میلی مولار حاوی ۱۰ میلی مولار DTNB مخلوط شد و در ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد و برای ارزیابی GSSG، ۱۰۰ میکرولیتر مایع رویی به ۳ میلی لیتر از محلول واکنش حاوی گلووتاتیون ردوکتاز (۱ U برای هر ۳ میلی لیتر محلول واکنش)، ۵۰۰ میلی لیتر بافر (pH=8.0) TRIS-HCl، ۱۵۰ میکرومولار NADPH، ۱ میلی لیتر EDTA، ۳ میلی لیتر $MgCl_2$ و ۱۰۰ میلی لیتر DTNB اضافه شد و در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. سپس شدت جذب نوری در ۴۱۲ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد [۲۵].

تجزیه و تحلیل آماری

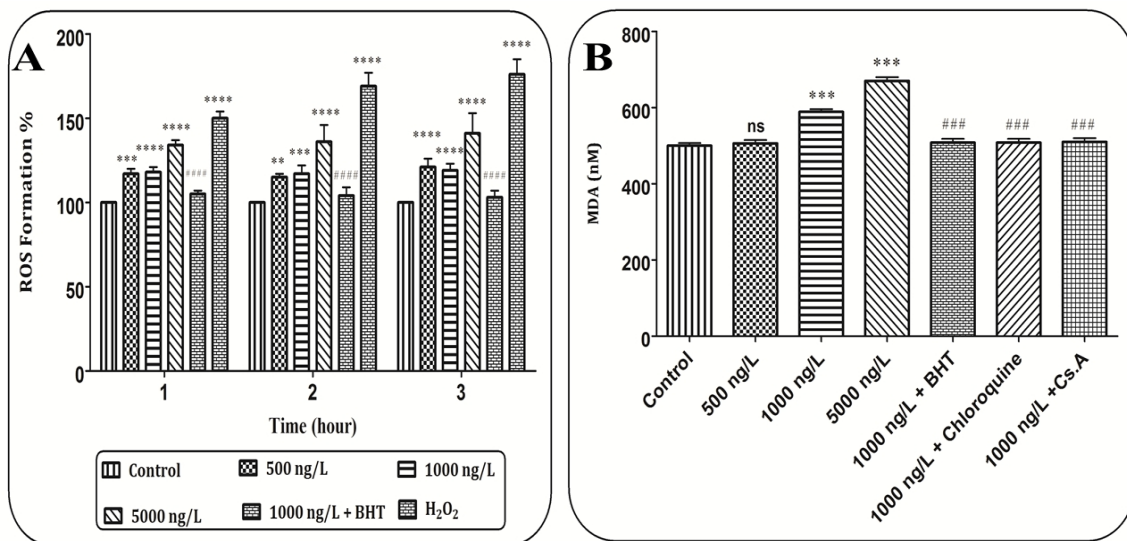
نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شدند. نتایج سه بار تکرار شدند. سطح معنی‌داری با استفاده از تست‌های ANOVA یک طرفه (توسط آزمون تعقیبی توکی) و ANOVA دو طرفه (توسط آزمون تعقیبی بونفرونی) تعیین شد. $p < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

MDA افزایش یافته ناشی از مواجهه با تولوئن (۱۰۰۰ نانوگرم/لیتر) توسط BHT (۵۰ میکرو مولار) مهار کننده تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن، سیکلوسپورین A (۵ میکرو مولار) به عنوان عامل بسته نگهدارنده روزنه میتوکندریایی و کلروکین (۱۰۰ میکرو مولار) به عنوان عامل لیزوزوموتروپیک و مهارکننده واکنش فنتون به طور معنی‌داری کاهش یافته است (شکل ۲B).

فعال اکسیژن مورد استفاده قرار گرفته است (شکل ۲A).

لیپید پراکسیداسیون

همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است، سطح مالون دی آلدئید (MDA) به عنوان شاخص لیپید پراکسیداسیون در لنفوسیت‌های مواجهه یافته با تولوئن در غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۵۰۰۰ نانوگرم/لیتر افزایش یافته است. در حالیکه، این اثر در غلظت ۵۰۰ نانوگرم/لیتر از تولوئن مشاهده نشده است. سطح



شکل ۲. (A) سطح تولید رادیکال فعال اکسیژن و (B) سطح لیپید پراکسیداسیون در لنفوسیت‌ها

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده اند (تعداد نمونه‌ها=۵). ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) و **** ($p < 0.0001$) نشان دهنده سطح معنی‌داری با گروه کنترل است. ### ($p < 0.001$) و #### ($p < 0.0001$) نشان دهنده سطح معنی‌داری با گروه تولوئن (۱۰۰۰ نانوگرم/لیتر) است.

در فواصل زمانی ۱، ۲ و ۳ ساعته در لنفوسیت‌های انسانی شده است. استفاده همزمان از سیکلوسپورین A و کلروکین با تولوئن (۱۰۰۰ نانوگرم/لیتر) سبب پیشگیری از آسیب لیزوزومی و پارگی غشای لیزوزومی ناشی از تولوئن در غلظت ۱۰۰۰ نانوگرم/لیتر در لنفوسیت‌های انسانی شده است (شکل ۳B).

سنجش GSH و GSSG

همانطور که در شکل ۴ نشان داده شده است انکوباسیون لنفوسیت‌ها با تولوئن در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۵۰۰ و ۵۰۰۰ نانوگرم/لیتر باعث تخلیه GSH داخل سلولی در لنفوسیت‌ها شده است (شکل ۴A).

ارزیابی آسیب میتوکندریایی

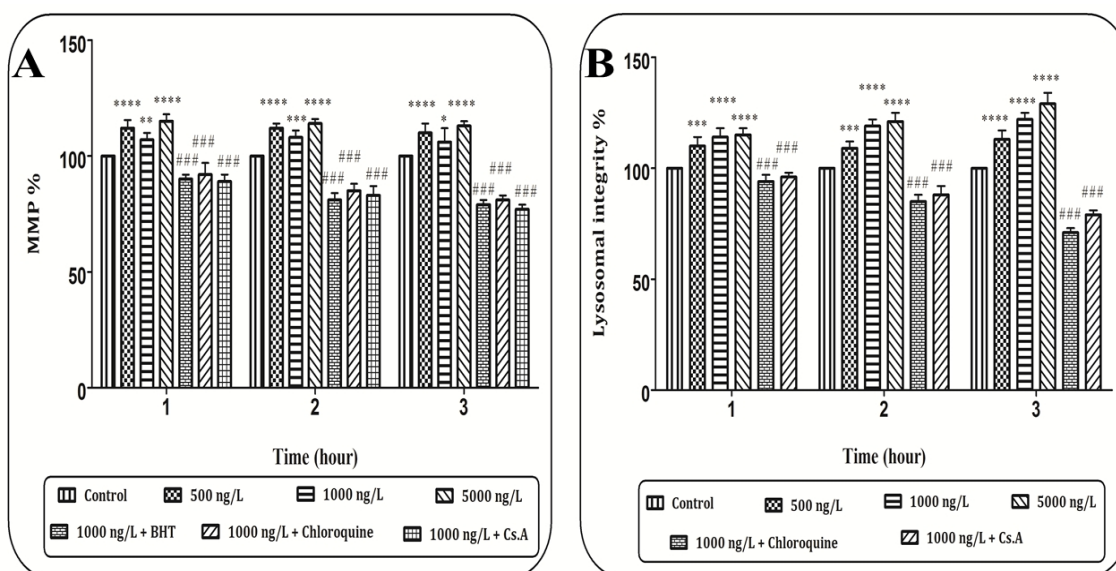
نتایج نشان داد که تولوئن در همه فواصل زمانی (۱، ۲ و ۳ ساعت) و در غلظت‌های ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۵۰۰۰ نانوگرم/لیتر به طور معنی‌داری ($p < 0.05$) سبب ایجاد آسیب میتوکندریایی در لنفوسیت‌های انسانی شده است. استفاده همزمان از BHT، سیکلوسپورین A و کلروکین با تولوئن (۱۰۰۰ نانوگرم/لیتر) منجر به کاهش آسیب میتوکندریایی شده است (شکل ۳A).

سنجش آسیب لیزوزومی

نتایج نشان داد که تولوئن در غلظت‌های ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۵۰۰۰ نانوگرم/لیتر سبب آسیب به غشای لیزوزوم

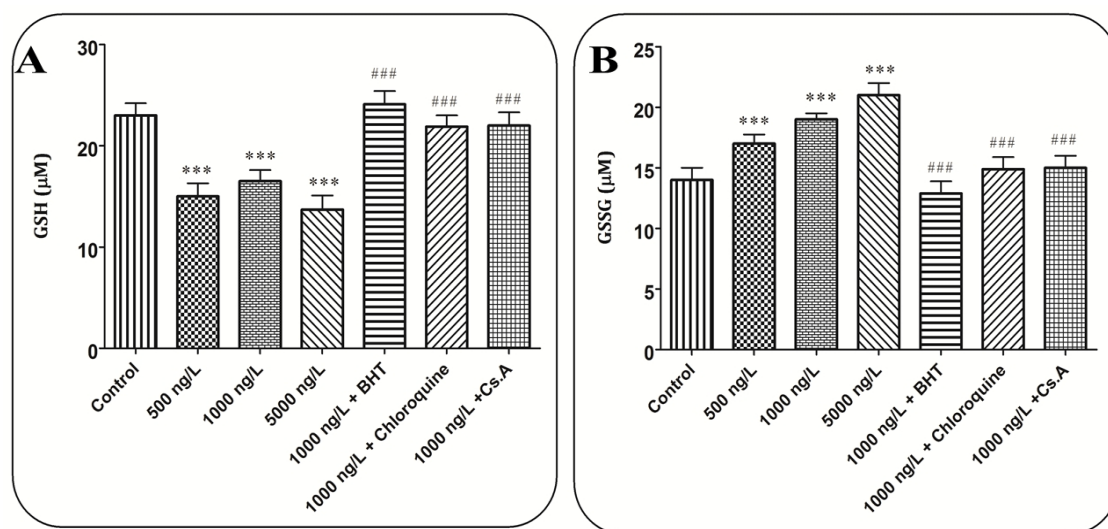
نانوگرم/لیتر) سبب پیشگیری از کاهش GSH داخل سلولی و افزایش خارج سلولی GSSG ناشی از تولوئن (۱۰۰۰ نانوگرم/لیتر) در لنفوسیت‌ها شده است (شکل A-B).

تخلیه GSH در لنفوسیت‌های مواجهه یافته با تولوئن ممکن است به خروج GSSG و افزایش خارج سلولی آن نسبت داده شود (شکل B). استفاده از BHT (۵۰ میکرو مولار)، سیکلوسپورین A (۵ میکرو مولار) و کلروکین (۱۰۰ میکرو مولار) با تولوئن (۱۰۰۰



شکل ۳. (A) سقوط پتانسیل غشاء میتوکندری و (B) یکپارچگی غشای لیزوزوم در لنفوسیت‌ها

داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده اند (تعداد نمونه‌ها = ۵). * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) و **** ($p < 0.0001$) نشان‌دهنده سطح معنی‌داری با گروه کنترل است. ### نشان‌دهنده سطح معنی‌داری با گروه تولوئن (۱۰۰۰ نانوگرم/لیتر) است.



شکل ۴. سنجش گلووتاتیون احیاء داخل سلولی (A) و گلووتاتیون اکسیده خارج سلولی (B)

داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده اند (تعداد نمونه‌ها = ۵). *** ($p < 0.001$) نشان‌دهنده سطح معنی‌داری با گروه کنترل است. ### نشان‌دهنده سطح معنی‌داری با گروه تولوئن (۱۰۰۰ نانوگرم/لیتر) است.

بحث

سمیت در سیستم ایمنی بواسطه نقش مهمی که در بدن ایفا می کند می تواند پیامدهای جبران ناپذیری را به همراه داشته باشد [۲۶]. مطالعات گذشته نشان داده اند که مواجهه با حلال های آلی و صنعتی اختلال در عملکرد نفوسیت های انسانی را به همراه دارد [۲۷]. برخی از محققین اثرات تولوئن بر نفوسیت های خون انسانی را مورد بررسی قرار داده اند [۲۰، ۲۱]، اما تا به اکنون مکانیسم های سلولی دخیل در اثرات تولوئن بر نفوسیت های خون انسانی به طور دقیق مورد بررسی قرار نگرفته است. بنابراین، این مطالعه به جهت بررسی آسیب میتوکندریایی و لیزوزومی در نفوسیت های انسانی در مواجهه با تولوئن در توجیه مواجهات شغلی و محیطی با آن طراحی شده است.

نتایج نشان داد که تولوئن باعث کاهش زنده ماندنی نفوسیت های انسانی شده است. این نتایج در توافق با نتایج مطالعات قبلی می باشد که نشان داده اند که حلال های صنعتی از جمله زایلن باعث کاهش زنده ماندنی نفوسیت ها می شوند [۲۷]. میتوکندری به عنوان یکی از مهمترین منابع تولید رادیکال های فعال اکسیژن و پیامد آن استرس اکسیداتیو ایفای نقش می کند. کمپلکس های I و III در زنجیره تنفسی میتوکندری در تولید رادیکال های فعال اکسیژن و استرس اکسیداتیو دخالت دارند. علاوه بر این، میتوکندری نقش مهمی در مرگ سلولی ایفا می کند. ساختارهای میتوکندریایی نسبت به استرس اکسیداتیو بسیار حساس هستند [۲۲، ۲۸]. مطالعات نشان داده اند که بسیاری از ترکیبات آلی سمیت خود را از طریق افزایش رادیکال های فعال اکسیژن در سلول های نرمال ایجاد می کنند [۲۷، ۲۹]. مواجهه با تولوئن می تواند با افزایش استرس اکسیداتیو همراه باشد [۹، ۱۰]. علاوه بر این، از پیامدهای مواجهه مزمن و طولانی مدت با تولوئن می توان به افزایش مولکول های پرو-اکسیداتیو و کاهش مارکرهای آنتی اکسیدانی اشاره کرد [۱۱، ۱۲].

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مواجهه با تولوئن باعث افزایش رادیکال های فعال اکسیژن در نفوسیت های انسانی شده است.

مطالعات گذشته نشان داده اند که آسیب میتوکندریایی منجر به خروج سیتوکروم C به عنوان یک پروتئین پرو-آپوپتوتیک از میتوکندری به سیتوزول و فعال سازی آبشاری کاسپازی و همچنین مرگ سلولی می شود. در حقیقت، سقوط پتانسیل غشاء میتوکندری به عنوان یکی از وقایع اولیه و برگشت ناپذیر در مرگ سلولی در نظر گرفته شده است [۳۰-۳۲]. نتایج نشان داد که در غلظت های مورد استفاده، تولوئن توانسته است سبب سقوط پتانسیل غشاء میتوکندری، آسیب میتوکندری و همچنین افزایش رادیکال های فعال اکسیژن در نفوسیت های انسانی شود، و توسط BHT به عنوان یک عامل آنتی اکسیدانی مهار شده است که نشان دهنده نقش رادیکال های فعال اکسیژن در آسیب میتوکندریایی می باشد.

گلوکاتایون به عنوان یک آنتی اکسیدان داخل سلولی نقش مهمی در پیشگیری از تولید رادیکال های فعال اکسیژن و لیپید پراکسیداسیون ایفا می کند. علاوه بر این گلوکاتایون در محافظت سلولی در برابر اثرات مخرب استرس اکسیداتیو دخالت دارد. بنابراین، تخلیه گلوکاتایون داخل سلولی به عنوان یک مارکر استرس اکسیداتیو در نظر گرفته می شود و ممکن است به افزایش سطح گلوکاتایون اکسیده خارج سلولی نسبت داده شود [۲۴]. نتایج نشان داد که هنگامی که نفوسیت ها با تولوئن انکوبه می شوند تخلیه گلوکاتایون به عنوان پیامد افزایش رادیکال های فعال اکسیژن و اکسیداسیون لیپیدی رخ داده است. طی سال های گذشته پیشنهاد شده است که اکسیداسیون لیپیدی می تواند نقش مهمی در سمیت ایجاد شده بواسطه حلال های آلی ایفا کند [۲۷، ۳۳]. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تولوئن سبب افزایش لیپید

پراکسیداسیون در غشای لنفوسیت‌ها شده است. همچنین پیشنهاد شده است که اکسیداسیون لیپیدی ناشی از مواجهه با تولوئن احتمالاً پیامد اختلال در سیستم دفاع انتی اکسیدانی از جمله گلوتاتیون و آنزیم‌های مرتبط با آن است. نتایج مطالعه تایید کننده این یافته‌ها است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تغییرات در سیستم دفاعی سلولی، یعنی کاهش محتوای گلوتاتیون احیاء داخل سلولی و افزایش گلوتاتیون اکسیده خارج سلولی، با آسیب میتوکندری و تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن همراه است. این نتایج در توافق با نتایج مطالعات گذشته می‌باشد [۲۷]. به علاوه نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که استفاده از ترکیبات با خواص انتی اکسیدانی و محافظت کننده‌های میتوکندریایی و لیزوزومی می‌توانند نقش موثری در کاهش سمیت‌های ایجاد شده توسط تولوئن در لنفوسیت‌های انسانی داشته باشد.

لیزوزوم‌ها برای تنظیم کنترل کیفیت میتوکندری‌ها مورد نیاز هستند، و استرس اکسیداتیو یکی از مشخصه‌های مشترک بیماری‌های ذخیره لیزوزومی است. میتوکندری‌ها به عنوان منابع اصلی رادیکال‌های فعال اکسیژن درون‌زاد در مجاورت فیزیکی با لیزوزوم‌ها قرار دارند. از این رو غشای لیزوزومی به‌طور بالقوه یک هدف در دسترس و مستقیم سیگنالینگ رادیکال‌های فعال اکسیژن است. رادیکال‌های فعال اکسیژن در لیزوزوم‌ها از طریق واکنش فنتون تولید می‌شوند [۳۴]. هیدروژن پراکساید (H_2O_2) که عمدتاً در میتوکندری‌ها تولید می‌شود، در مقادیر غیرنرمال به درون لیزوزوم‌ها انتشار می‌یابد [۳۵]. مواجهه لنفوسیت‌های انسانی با تولوئن سبب ورود

رنگ آکریدین اورنج به بخش سیتوزولی شده است که نشان دهنده آسیب به غشای لیزوزوم و نشت غشای آن می‌باشد. از طریق دیگر، آسیب غشای لیزوزومی در لنفوسیت‌ها بواسطه مواجهه با تولوئن توسط کلروکین، سیکلوسپورین A و BHT کاهش یافته است. این نتایج می‌توانند بر نقش واکنش‌های شبه فنتونی داخل لیزوزومی وابسته به pH و تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن در آسیب غشای لیزومی لنفوسیت‌های انسانی بواسطه مواجهه با تولوئن دلالت داشته باشند.

نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان داد که تولوئن از طریق تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن و آسیب‌های میتوکندری و لیزوزومی برای لنفوسیت‌های انسانی سمی است که در نهایت منجر به استرس اکسیداتیو، کاهش گلوتاتیون و سمیت سلولی می‌شود. علاوه بر این نتایج مطالعه نشان می‌دهد که استفاده از ترکیبات با خواص آنتی اکسیدان، محافظت کننده‌های میتوکندریایی و لیزوزومی می‌توانند نتایج امیدبخشی در کاهش سمیت ناشی از تولوئن در افراد مواجهه یافته از طریق محیطی و شغلی داشته باشد.

تشکر و قدردانی

نتایج ارائه شده در این مقاله از پایان نامه خانم دکتر بهناز شجاع‌طلاتیپه (فارغ التحصیل داروسازی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی) به شماره ۱۳۶۵ تحت نظارت پروفیسور جلال پوراحمد و دکتر احمد سلیمی استخراج شده است.

References

- 1- Soares MV, Charao MF, Jacques MT, Dos Santos ALA, Luchese C, Pinton S, et al. Airborne toluene exposure causes germline apoptosis and neuronal damage that promotes neurobehavioural changes in *Caenorhabditis elegans*. *Environ Pollut*. 2020 Jan;256:113406.
- 2- Obinna VC, Agu GO. Haematological effect of toluene in wistar rats. *JSRR*. 2019 Dec:1-7.

- 3- Pelletti G, Rossi F, Garagnani M, Barone R, Roffi R, Pelotti S. Medico-legal implications of toluene abuse and toxicity. Review of cases along with blood concentrations. *Leg Med (Tokyo)*. 2018 Sep;34:48-57.
- 4- Arslan S, Uzunhasan I, Kocas BB, Cetinkal G, Arslan S, Kocas C, et al. Effect of chronic toluene exposure on heart rhythm parameters. *PACE*. 2018 Jul;41:783-7.
- 5- Cosnier F, Nunge H, Bonfanti E, Grossmann S, Lambert-Xollin AM, Muller S, et al. Toluene and methylethylketone: effect of combined exposure on their metabolism in rat. *Xenobiotica*. 2018 Aug;48:684-94.
- 6- Neghab M, Rahimian JT, Jahangiri M, Karimi A, Nasiri G, Aghabeigi M, et al. Evaluation of hematotoxic potential of benzene, toluene, xylene, ethyl benzene and n-hexane in petrochemical industries. *Safety Promot Inj Prev*. 2015;2:293-302.
- 7- Sahin A, Ozer V, Akkaya F, Kaplan S. Successful resuscitation of prolonged cardiac arrest occurring in association with 'skunk' and toluene toxicity. *Turk J Emerg Med*. 2018 Dec;18:172-5.
- 8- Vitale CM, Gutovitz S. Aromatic (Benzene, Toluene) Toxicity. *Stat Pearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing StatPearls Publishing LLC.; 2020.
- 9- Kodavanti PR, Royland JE, Moore-Smith DA, Besas J, Richards JE, Beasley TE, et al. Acute and subchronic toxicity of inhaled toluene in male Long-Evans rats: Oxidative stress markers in brain. *Neurotoxicology*. 2015 Dec;51:10-9.
- 10- Kodavanti PR, Royland JE, Richards JE, Besas J, Macphail RC. Toluene effects on oxidative stress in brain regions of young-adult, middle-age, and senescent Brown Norway rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011 Nov;256:386-98.
- 11- Montes S, Yee-Rios Y, Paez-Martinez N. Environmental enrichment restores oxidative balance in animals chronically exposed to toluene: Comparison with melatonin. *Brain Res Bull*. 2019 Jan;144:58-67.
- 12- Xiong F, Li Q, Zhou B, Huang J, Liang G, Zhang L, et al. Oxidative stress and genotoxicity of long-term occupational exposure to low levels of BTEX in gas station workers. *Int J Environ Res Public Health*. 2016 Dec;13.
- 13- Islam MT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol Res*. 2017 Nov;39:73-82.
- 14- Newsholme P, Cruzat VF, Keane KN, Carlessi R, de Bittencourt Jr PIH. Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. *Biochem J*. 2016 Dec;473:4527-50.
- 15- Tonnie E, Trushina E. Oxidative stress, synaptic dysfunction, and alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2017 Apr;57:1105-21.
- 16- Schofield JH, Schafer ZT. Mitochondrial reactive oxygen species and mitophagy: A complex and nuanced relationship. *Antioxid Redox Signal*. 2020 Apr. In Press
- 17- Shin JS, So WM, Kim SY, Noh M, Hyoung S, Yoo KS, et al. CBSX3-Trxo-2 regulates ROS generation of mitochondrial complex II (succinate dehydrogenase) in Arabidopsis. *Plant Sci*. 2020 May;294:1-11.
- 18- Abdel-Daim MM, Dessouki AA, Abdel-Rahman HG, Eltaysh R, Alkahtani S. Hepatorenal protective effects of taurine and N-acetylcysteine against fipronil-induced injuries: The antioxidant status and apoptotic markers expression in rats. *Sci Total Environ*. 2019 Feb;650:2063-73.
- 19- Wang X, Martinez MA, Wu Q, Ares I, Martinez-Larranaga MR, Anadon A, et al. Fipronil insecticide toxicology: oxidative stress and metabolism. *Crit Rev Toxicol*. 2016 Sep;46:876-99.
- 20- Chen CS, Hseu YC, Liang SH, Kuo JY, Chen SC. Assessment of genotoxicity of methyl-tert-butyl ether, benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene to human lymphocytes using comet assay. *J Hazard Mater*. 2008 May;153:351-6.
- 21- Richer CL, Chakrabarti S, Senecal-Quevillon M, Duhr MA, Zhang XX, Tardif R. Cytogenetic effects of low-level exposure to toluene, xylene, and their mixture on human blood lymphocytes. *Int Arch Occup Environ Health*. 1993 Jan;64:581-5.
- 22- Salimi A, Roudkenar MH, Sadeghi L, Mohseni A, Seydi E, Pirahmadi N, et al. Ellagic acid, a polyphenolic compound, selectively induces ROS-mediated apoptosis in cancerous B-lymphocytes of CLL patients by directly targeting mitochondria. *Redox Biol*. 2015 Dec;6:461-71.

- 23- Salimi A, Talatappe BS, Pourahmad J. Xylene induces oxidative stress and mitochondria damage in isolated human lymphocytes. *Toxicological research*. 2017;33:233-8.
- 24- Salimi A, Vaghar-Moussavi M, Seydi E, Pourahmad J. Toxicity of methyl tertiary-butyl ether on human blood lymphocytes. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2016 Jan;23:8556-64.
- 25- Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical biochemistry*. 1976;74:214-26.
- 26- Reiche EM, Nunes SO, Morimoto HK. Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lancet Oncol*. 2004 Oct;5:617-25.
- 27- Kannan MM, Quine SD. Ellagic acid protects mitochondria from β -adrenergic agonist induced myocardial damage in rats; evidence from in vivo, in vitro and ultra structural study. *Food Res Int*. 2012 Jan;45:1-8.
- 28- Singh MP, Reddy MK, Mathur N, Saxena D, Chowdhuri DK. Induction of hsp70, hsp60, hsp83 and hsp26 and oxidative stress markers in benzene, toluene and xylene exposed *Drosophila melanogaster*: role of ROS generation. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009 Mar;235:226-43.
- 29- Gottlieb E, Armour SM, Harris MH, Thompson CB. Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. *Cell Death Differ*. 2003 May;10:709-17.
- 30- Ly JD, Grubb DR, Lawen A. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update. *Apoptosis*. 2003 Mar;8:115-28.
- 31- Yuan L, Wang J, Xiao H, Xiao C, Wang Y, Liu X. Isoorientin induces apoptosis through mitochondrial dysfunction and inhibition of PI3K/Akt signaling pathway in HepG2 cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012 Nov;265:83-92.
- 32- Jajte J, Stetkiewicz J, Wronska-Nofer T. Combined exposure to m-xylene and ethanol: oxidative stress in the rat liver. *Int J Occup Med Environ Health* 2003 Nov;16:345-50.
- 33- Zhang X, Cheng X, Yu L, Yang J, Calvo R, Patnaik S, et al. MCOLN1 is a ROS sensor in lysosomes that regulates autophagy. *Nat Commun*. 2016 Jun;7:1-12.
- 34- Kurz T, Terman A, Gustafsson B, Brunk UT. Lysosomes and oxidative stress in aging and apoptosis. *BBA*. 2008 Nov;1780:1291-303.