

# بیان ژن TGF- $\beta$ در سلول‌های فیبروبلاست راه‌هوایی مصدومین شیمیایی

منیره سادات میرزمانی<sup>۱</sup>، صمد زارع<sup>۲</sup>، عباسعلی ایمانی فولادی<sup>۳</sup>، محمدرضا نورانی<sup>\*۱</sup>

<sup>۱</sup> آزمایشگاه ژنومیک، مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران، <sup>۲</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، <sup>۳</sup> مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران

\*نویسنده پاسخگو: Email: r.nourani@yahoo.com

## چکیده

مقدمه: استفاده گسترده از سولفورموستارد به عنوان جنگ افزار شیمیایی اثرات سمی طولانی مدتی به جای گذاشته‌است. بنابراین تمام متخصصان سلامت باید دانش کافی و آمادگی مقابله با هرگونه حمله شیمیایی مشابه را داشته‌باشند. فاکتور تغییردهنده‌ی رشد (TGF- $\beta$ ) نقش مهمی در بیماری‌های مزمن راه‌هوایی، از جمله فرایند تغییر ساختار راه‌هوایی که منجر به انسداد راه‌هوایی می‌شود، ایفا می‌کند. این تغییرات مورفولوژیک در دیواره راه‌هوایی با افزایش سنتز ماتریکس خارج سلولی توسط فیبروبلاست‌های راه‌هوایی و رسوب در دیواره راه‌هوایی صورت می‌گیرد. TGF- $\beta$  نقش قابل توجهی در تغییر فعالیت فیبروبلاست‌ها در جهت تغییر ساختار راه‌هوایی دارد. هدف از مطالعه حاضر جداسازی و دستیابی به سلول‌های فیبروبلاست اولیه راه‌هوایی به صورت مستقیم از نمونه‌های بیوپسی راه‌هوایی مصدومین شیمیایی و نمونه‌های کنترل و بررسی بیان ژن TGF- $\beta$ 1 و TGF- $\beta$ 2 در سلول‌های فیبروبلاست جداسازی شده، به منظور مطالعه *in vitro* اثرات مخرب گاز سولفورموستارد بر مجاری هوایی و درک مکانیسم‌های مولکولی آسیب‌های ناشی از سولفورموستارد با هدف توسعه اقدامات پزشکی به منظور درمان و پیشگیری از این آسیب‌ها می‌باشد. مواد و روش‌ها: در این مطالعه با کمک تکنیک‌های کشت سلولی سلول‌های فیبروبلاست از بافت بیوپسی راه‌هوایی جدا و کشت داده‌شدند. پس از استخراج RNA از سلول‌های فیبروبلاست و سنتز cDNA، بیان ژن‌های TGF- $\beta$ 1 و TGF- $\beta$ 2 در سطح mRNA، در دو گروه مصدومین شیمیایی و افراد کنترل، توسط روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌ها: نتایج نشان‌دادند که ایزوفروم‌های TGF- $\beta$ 1 و TGF- $\beta$ 2، در سلول‌های فیبروبلاست اولیه در هر دو گروه بیان می‌شوند. بررسی‌های آماری نشان می‌دهد که بیان ژن‌های TGF- $\beta$ 1 و TGF- $\beta$ 2 به طور معنی‌داری در نمونه‌های مصدومین شیمیایی به نسبت نمونه‌های کنترل افزایش می‌یابد. نتیجه‌گیری: روش به کار گرفته‌شده در این مطالعه روش توانمندی در جداسازی سلول‌های فیبروبلاست از نمونه‌های بیوپسی می‌باشد و نتایج نشان داد که TGF- $\beta$ 1 و TGF- $\beta$ 2 نقش مهمی در بیماری‌های مزمن ریوی مصدومین شیمیایی، از جمله در تغییر ساختار راه‌هوایی بازی می‌کند.

کلید واژه: فیبروبلاست، TGF- $\beta$ ، سولفورموستارد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۵/۳

## مقدمه

استفاده گسترده از سولفورمستارد به عنوان جنگ‌افزار شیمیایی در قرن گذشته اثرات سمی طولانی مدتی به‌جای گذاشته‌است، بعلاوه امکان استفاده مجدد از این ترکیب سیتوتوکسیک به عنوان عامل تروریستی و سلاح شیمیایی وجود دارد. بنابراین، تمام متخصصان سلامت باید دانش کافی و آمادگی مقابله با هرگونه حمله شیمیایی مشابه را داشته‌باشند (۱). سولفورمستارد عامل تاول‌زایی است که استفاده از آن به عنوان جنگ‌افزار شیمیایی، مهمترین کاربرد این ترکیب محسوب می‌شود (۲). آخرین استفاده نظامی از آن در جنگ عراق علیه ایران (۱۹۸۰-۱۹۸۸) بود که توسط رژیم بعثی عراق علیه افراد نظامی و غیرنظامی مورد استفاده قرار گرفت و سبب مصدوم‌شدن حدود ۱۰۰ هزار نفر گردید. هم‌اکنون حدود یک سوم آن‌ها از عوارض مزمن ریوی آن رنج م‌برند. پوست، چشم، سیستم تنفسی، سیستم عصبی مرکزی و مغز استخوان از مهمترین اندام‌هایی هستند که درگیر عوارض کوتاه مدت گاز خردل می‌شوند، اما ضایعات سیستم تنفسی، پوست و چشم از عوارض مزمن آن می‌باشند (۳-۷).

فاکتور تغییردهنده‌ی رشد بتا یکی از زیر خانواده‌های تیپیک خانواده‌ی TGF می‌باشد. تقریباً تمام انواع سلول‌های بدن از جمله سلول‌های اندوتلیال، اپیتلیال، عصبی، بافت پیوندی و هماتوپویتیک، TGF- $\beta$  و گیرنده‌های آن را سنتز می‌کنند (۸). TGF- $\beta$  به صورت اتوکراین، پاراکراین و گاهی اندوکراین عمل می‌کند و مسئول تنظیم فرایندهای مختلفی از جمله تکثیر سلولی، تمایز، آپوپتوز، هموستاز ماتریکس خارج سلولی، تکوین جنینی، ترمیم زخم‌ها و آنژیوژنز می‌باشد (۱۰-۸). این سایتوکاین نقش مهمی در ریه بیماران مبتلا به برخی از بیماری‌های مزمن راه‌های هوایی، به ویژه در فرایند بازسازی راه‌هوایی ایفا می‌کند (۱۱). تغییرات عمده در ساختار دیواره برونش، در بسیاری از بیماران مبتلا به آسم تشخیص داده شده‌است که منجر به انسداد راه‌هوایی به‌صورت غیرقابل برگشت شده‌است (۱۲). اعتقاد بر این است که این تغییرات مورفولوژیک با افزایش سنتز کلاژن (نوع اول، سوم و پنجم) توسط فیبروبلاست‌های راه‌هوایی و رسوب در دیواره راه‌هوایی صورت می‌گیرد (۱۳). در میان فاکتورهای رشد متعددی که در فرایند التهاب راه‌هوایی و ترمیم بافت فعال

هستند، TGF- $\beta$  نقش برجسته‌ای در تغییر فعالیت فیبروبلاست‌ها، که منجر به بازسازی راه‌هوایی می‌شود، دارد (۱۴).

بازسازی راه‌هوایی با تجمع غیرطبیعی ماتریکس خارج سلولی مشخص می‌شود. TGF- $\beta$  به عنوان یک مولکول میانجیگر کلیدی در تحریک تجمع ماتریکس خارج سلولی شناخته شده‌است. شواهد نشان می‌دهد که فیبروبلاست‌ها منبع اصلی رسوب ماتریکس خارج سلولی می‌باشند (۱۵). فنوتیپ غیرطبیعی فیبروبلاست در اختلالات فیبروتیک در بیماری‌های ریوی (۱۶) مشاهده و گزارش شده‌است که به نظر می‌رسد این فنوتیپ غیرطبیعی در پاسخ به یکی از مهمترین مولکول‌های سیگنالینگ در اختلالات فیبروتیک یعنی TGF- $\beta$ ، بوجود آمده‌باشد (۱۷).

سلول‌های راه‌هوایی، نظیر سلول‌های اپیتلیال، فیبروبلاست و سلول‌های ماهیچه‌ای صاف می‌توانند از بافت مجاری هوایی جدا شده و به عنوان سلول‌های اولیه به منظور مطالعات *in vitro* بر روی خصوصیات و واکنش هر یک از این سلول‌ها به دنبال آسیب‌دیده‌گی استفاده‌شوند. چنین مدل‌هایی به مطالعه بیشتر ارتباط این سلول‌ها و پاسخ شان به آسیب کمک می‌کند (۱۸).

## مواد و روش‌ها

مطالعه انجام‌شده از نوع تجربی بود. جامعه مورد مطالعه شامل دو گروه مصدومین شیمیایی دارای سابقه مواجهه با سولفورمستارد و افراد کنترل بود. گروه مصدومین شامل افرادی بودند که به دلیل ناراحتی‌های ریوی ناشی از مسمومیت مستند قبلی با سولفورمستارد در جنگ تحمیلی و با تایید پزشکان فوق تخصص ریه انتخاب شدند. گروه کنترل نیز شامل افرادی بودند که به دلیل ناراحتی ریوی و به دستور پزشک متخصص تحت عمل برونکوسکوپی قرار می‌گرفتند، ولی براساس عکس‌های ریوی و داده‌های برونکوسکوپی هیچ‌گونه عارضه شناخته شده‌ی ریوی را نشان نمی‌دادند. افراد سیگاری، بیماران مبتلا به سرطان ریه، آسم، سل و افراد مسن از مطالعه ما حذف شدند. نمونه‌های بافت‌های ریوی این تحقیق از بخش برونکوسکوپی مجتمع بیمارستانی بقیه‌الله الاعظم جمع‌آوری شدند. نمونه‌گیری از دیواره راه‌های هوایی در فاصله زمانی خرداد ۱۳۸۹ تا آبان ۱۳۸۹ انجام‌شد. نمونه‌های مورد نظر تحت نظارت مستقیم پزشکان

۵ نمونه کنترل جمع‌آوری و در لوله‌های فالکن استریل حاوی محیط کشت DMEM قرار داده شد و پس از انتقال به آزمایشگاه، مراحل کشت بافت به منظور جداسازی سلول‌های فیبروبلاست بروی نمونه‌های بیوپسی انجام شد. میانگین سنی افرادی که از آن‌ها نمونه دریافت شد در جدول ۱ آورده شده است.

فوق تخصص ریه و با پنس‌های مخصوص در حین برونکوسکوپی جمع‌آوری شدند. برای رعایت مسائل اخلاقی، قبل از گرفتن نمونه، دلایل و علل نمونه‌گیری هم برای افراد بیمار و هم افراد کنترل کاملاً تشریح شده و با جلب رضایت این افراد و اخذ رضایت نامه کتبی اقدام به نمونه‌گیری شد. تعداد ۵ نمونه بیوپسی مصدوم شیمیایی و

جدول ۱: میانگین سنی افرادی که از آن‌ها نمونه گرفته شد.

P-value	گروه کنترل N=۵	گروه مواجهه N=۵	
۰,۶۷	۵۵-۴۳	۵۴-۴۲	دامنه سن
	۴۹,۴±۵,۶	۴۷,۸±۵	سن (میانگین±انحراف معیار)

میزان ۲۰۰ ماکرولیتر کلروفرم به هر نمونه اضافه و پس از تکان دادن و قرارگرفتن به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد در دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه (rpm) سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ فاز رویی توسط سمپلر عاری از آنزیم‌های تجزیه‌کننده RNA (RNase free) به آرامی جدا و به میکروتیوپ‌های استریل منتقل و هم حجم آن ایزوپروپانل به آرامی مخلوط شد و به مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد در دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. رسوب جداسازی و به آن ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد اضافه گردید و به مدت ۸ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد در دور ۷۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. در نهایت RNA در آب تیمار شده با DEPC حل شد.

#### ارزیابی خلوص و کیفیت RNA استخراج شده

پس از استخراج RNA به منظور ارزیابی کمیت RNA استخراج شده و تعیین غلظت و درجه خلوص آن، از دستگاه اسپکتروفتومتر نانو دراپ (NanoDrop, USA) استفاده شد. این دستگاه به طور اتوماتیک غلظت RNA را با استفاده از جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر، محاسبه می‌کند. پس از آماده‌سازی نمونه و گذاردن آن در مکان قرارگیری نمونه، دستگاه غلظت نمونه مورد نظر را در طول موج مربوطه، بر حسب نانوگرم برماکرولیتر، محاسبه می‌نماید.

از طرفی نمونه RNA دارای کیفیت استاندارد می‌باشد که الگوی باند ویژه‌ای روی ژل آگارز نشان دهد. حضور

#### جداسازی و کشت سلول‌های فیبروبلاست مشتق از بافت برونشبال ربوی

به منظور جداسازی سلول‌های فیبروبلاست از نمونه‌های بیوپسی گرفته شده، از روش Explant استفاده شد. پس از انتقال نمونه بیوپسی برونش به آزمایشگاه، نمونه با PBS به آرامی شستشو داده شد. سپس نمونه بافتی با استفاده از تیغ جراحی به قطعات کوچک ۲ تا ۳ میلی‌متری بریده شد و در پلیت کشت شش خانهای حاوی محیط کشت DMEM (۱۰٪ FBS، ۱٪ محلول بافر HEPES ۱ مولار، ۱٪ اسید آمینه غیرضروری و ۱٪ پنی‌سیلین/استرپتومایسین) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور رطوبت‌دار با غلظت ۵٪ دی‌اکسیدکربن نگهداری شدند. هر ۳ روز محیط کشت سلول‌ها با محیط کشت تازه تعویض شد. در طی دو هفته اول اکثریت سلول‌های غیرفیبروبلاست (اپیتلیال و اندوتلیال) از بین می‌روند در حالی که فیبروبلاست‌ها به رشد و تقسیم ادامه می‌دهند در نتیجه به‌عنوان سلول‌های غالب استقرار می‌یابند. در این زمان می‌توان قطعات بافتی باقی‌مانده از ظرف کشت خارج و با استفاده از محلول تریپسین-EDTA سلول‌ها را به فلاسک‌های کشت سلولی ۲۵ سانتی‌متر مربع منتقل کرد.

#### استخراج RNA

استخراج RNA از سلول‌های فیبروبلاست، با استفاده از محلول Trepure Isolation reagent (Roch, Germany) طبق دستورالعمل انجام شد. ابتدا محیط کشت سلول‌ها کاملاً خارج و Trepure به فلاسک اضافه و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس

پس از انجام واکنش رونویسی معکوس، به منظور تکثیر قطعه مورد نظر واکنش، از روی cDNA سنتز شده، PCR انجام شد. ۱ ماکرولیتر از cDNA سنتز شده با ۲٫۵ ماکرولیتر بافر تکثیر ۱۰×، ۱ ماکرولیتر مخلوط dNTP، ۰٫۳ ماکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase، ۱ ماکرولیتر MgCl<sub>2</sub>، ۱ ماکرولیتر پرایمر بالا دست و پایین دست و آب دو بار تقطیر تا حجم ۲۵ ماکرولیتر، مخلوط شد. مراحل PCR توسط دستگاه (Eppendorf, Hamburg, Germany) asterCycler پرایمرها و برنامه زمانی و دماهای لازم جهت انجام واکنش PCR در جداول ۲ و ۳ ذکر شده است.

الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز، محصولات تکثیر شده PCR، بر روی ژل آگارز ۱٫۵ درصد الکتروفورز از هم جدا شدند. سپس با رنگ اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و با تاباندن نور ماوراء بنفش توسط دستگاه UV Transluminator باندهای ایجاد شده مشاهده و تفسیر گردید.

باندهای RNA ریبوزومی ۱۸S و ۲۸S نشان دهنده سالم و دست نخورده بودن RNA است. در این مطالعه برای ارزیابی کیفیت RNA استخراج شده الکتروفورز نمونه‌های RNA بروی ژل آگارز ۱٪ انجام شد.

#### سنتز DNA مکمل (cDNA)

۵۰۰ نانوگرم از RNA استخراج شده از سلول‌های فیبروبلاست، به عنوان الگو جهت سنتز cDNA، مطابق با کیت ساخت cDNA (Bioneer, Korea) استفاده شد. سپس برنامه زمانی-دمایی به صورت ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۳ درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه، ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه (۱۲ سیکل) و ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه (دمای غیرفعال سازی) انجام شد. پس از اتمام سنتز cDNA، میکروتیوپ‌ها را به فریزر -۲۰ درجه سانتیگراد منتقل شد.

واکنش PCR، تکثیر ژن‌های مورد نظر از روی cDNA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی

جدول ۲. توالی و اطلاعات مربوط به پرایمرها

نام ژن	نوع پرایمر	توالی پرایمر	دمای اتصال C°	طول قطعه مورد نظر bp
TGF-β1	F	5'TGTGACAGCAGGGATAACAC3'	۵۹	۲۴۲
	R	5'TGAAGCAATAGTTGGTGTCC3'		
TGF-β2	F	5'TTGACGTCTCAGCAATGGAG3'	۵۷	۲۲۰
	R	5'TCAGTTACATCGAAGGAGAGC3'		
β-actin	F	5'TCATGAAGATCCTCACCGAG3	۵۹	۱۹۰
	R	5'TTGCCAATGGTGATGACCTG3'		

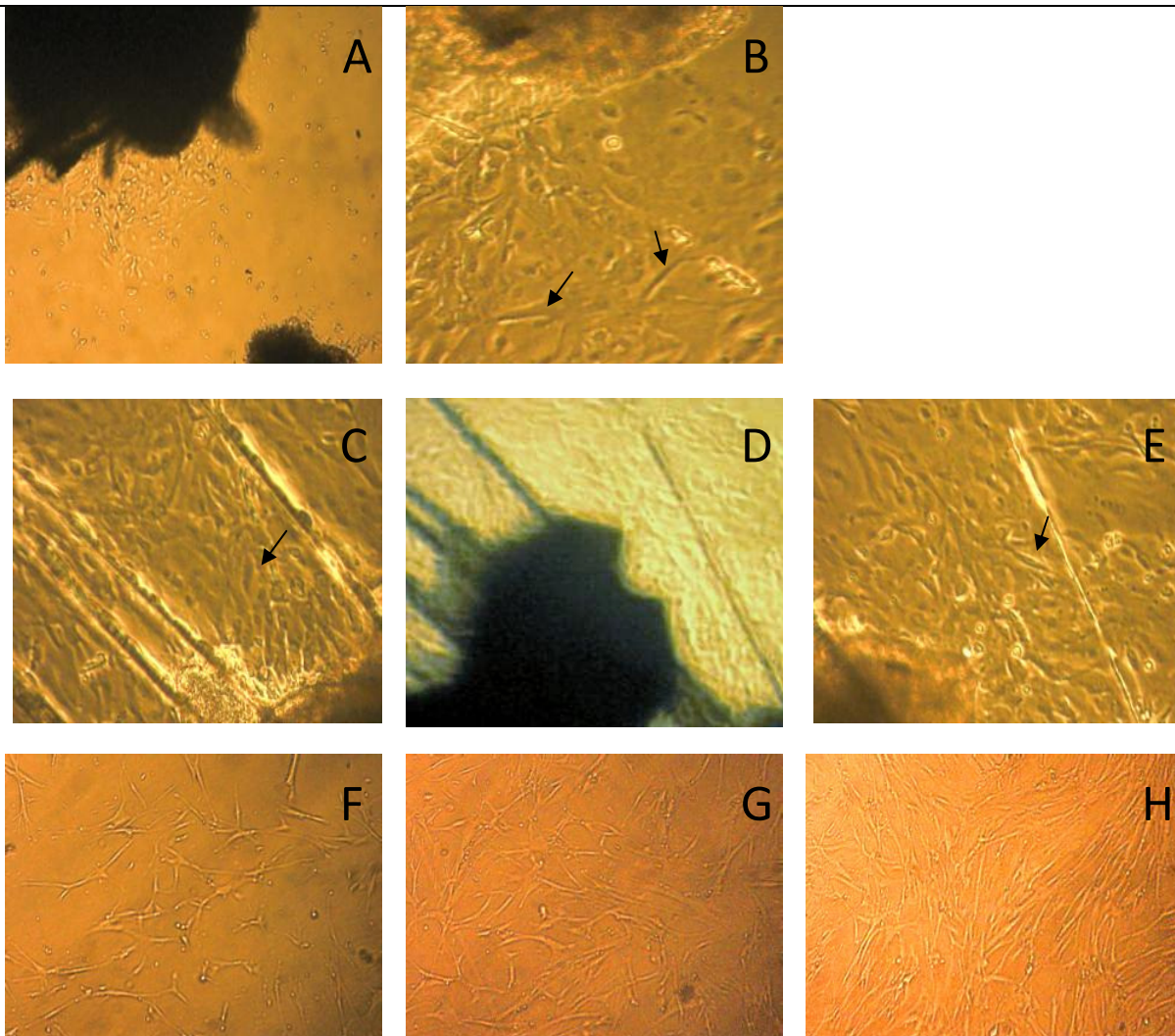
جدول ۳. برنامه زمانی-دمایی لازم جهت انجام واکنش PCR

تعداد سیکل	زمان	دما (درجه سانتیگراد)	سیکل‌های واکنش
۱	۳ دقیقه	۹۵	Initiation
۳۳	۳۰ ثانیه	۹۵	Denaturation Annealing Extension
	۳۰ ثانیه	۵۱-۶۱	
۱	۱ دقیقه	۷۲	
۱	۵ دقیقه	۷۲	End terminal extension

## یافته‌ها

کشت سلولی (جداسازی و کشت اولیه سلول‌های فیبروبلاست از بافت راه‌های هوایی) یک هفته پس از کشت بافت سلول‌های فیبروبلاست از بافت جدا شده و به صورت سلول‌های انفرادی در محیط کشت سلول، در اطراف بافت مشاهده شدند. دو هفته بعد از کشت، شمار فیبروبلاست‌ها به صورت چشمگیری

افزایش یافت. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم مناسب، سلول‌ها به فلاسک کشت منتقل شدند و مراحل رشد و تکثیر خود را در فلاسک‌های کشت طی کردند. سلول‌ها در پاساژ ۳ تا ۵، پس از رسیدن به تراکم مناسب و در شرایط مناسب، برای مطالعات مولکولی استفاده شدند.



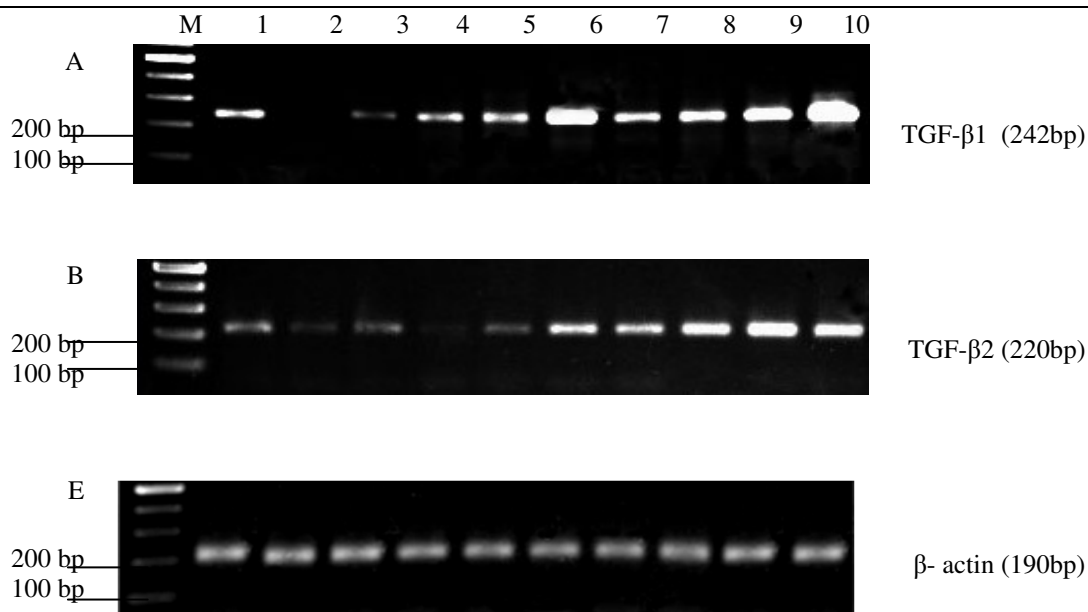
شکل ۱. شمای میکروسکوپی از کشت اولیه فیبروبلاست. سلول‌های جدا شده از بافت راه‌هوایی. در ۵ روز پس از کشت اولیه، مشاهده می‌شود تعداد کمی سلول‌های فیبروبلاستی شکل از بافت کشت داده شده جدا شده و به اطراف مهاجرت کردند (A,B). در ده روز پس از کشت اولیه، تعداد سلول‌های فیبروبلاستی شکل قابل مشاهده بیشتر شده و بعضی از آن‌ها تشکیل کلونی داده‌اند (C,D,E). رشد و تکثیر سلول‌های فیبروبلاست پس از انتقال به فلاسک: ۲۴ ساعت پس از انتقال به فلاسک (F)، روز پنجم (G) و روز چهاردهم (H). قابل ذکر است که فیبروبلاست‌ها از لبه‌های بافت به خارج مهاجرت می‌کنند (A,B) و به تراکم می‌رسند (C,D,E). پس از انتقال به فلاسک فیبروبلاست‌ها به کف فلاسک می‌چسبند (F)، تکثیر می‌شوند و پراکنده می‌شوند (G) و به تراکم می‌رسند (H).

از نمونه‌های RNA استخراج شده از سلول‌های فیبروبلاست راه‌های هوایی، cDNA ساخته شد و با

میزان بیان ژن‌های TGF- $\beta$ 1 و TGF- $\beta$ 2 در سلول‌های فیبروبلاست راه‌هوایی

TGF- $\beta$ 2 نمونه‌های کنترل و چاهک‌های ۶ تا ۱۰ نمونه‌های مصدومین شیمیایی را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود بیان این ژن در مصدومین شیمیایی نسبت به نمونه‌های کنترل افزایش یافته‌است. قسمت پائین شکل ۲، ژن بتاکتین نمونه‌های کنترل و شیمیایی را نشان می‌دهد. چاهک ۱ تا ۵ شامل باند ۱۹۰ جفت باز ژن بتاکتین نمونه‌های کنترل و چاهک‌های ۶ تا ۱۰ شامل نمونه‌های مصدومین شیمیایی می‌باشد. نتایج نشان‌داد که تغییری در میزان بیان این ژن در بین دو گروه کنترل و بیمار وجود ندارد.

استفاده از cDNA سنتز شده به عنوان الگو، واکنش PCR انجام شد. هم زمان با انجام PCR برای ژن‌های هدف، پرایمرهای ژن بتاکتین (ژنی که به صورت عمومی در تمام سلول‌ها وجود دارد) هم که قطعه‌ای به طول ۱۹۰ جفت‌بازی را سنتز می‌کرد، استفاده شد. پرایمر طراحی شده برای TGF- $\beta$ 1 و TGF- $\beta$ 2 به ترتیب توانایی سنتز قطعه‌هایی به طول ۲۴۲ و ۲۲۰ جفت باز از ژن‌های مورد نظر را داشتند. شکل ۲ نتایج حاصل از RT-PCR ژن‌های TGF- $\beta$ 1 و TGF- $\beta$ 2 نمونه‌های کنترل در مقایسه با نمونه‌های شیمیایی را نشان می‌دهد. چاهک‌های شماره ۱ تا ۵ ژن‌های TGF- $\beta$ 1 و



شکل ۲. الف و ب: الکتروفورز نتایج RT-PCR ژن‌های TGF- $\beta$ 1 و TGF- $\beta$ 2 در سلول‌های فیبروبلاست راه‌هوایی: چاهک (M) شاخص اندازه مولکولی 100bp (غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر)، چاهک شماره ۱ تا ۵ ژن‌های TGF- $\beta$ 1 و TGF- $\beta$ 2 نمونه‌های کنترل و چاهک‌های ۶ تا ۱۰ نمونه‌های بیماران شیمیایی را نشان می‌دهد. بیان هر دو ژن در بیماران شیمیایی افزایش یافته‌است. ج) الکتروفورز نتایج RT-PCR ژن بتاکتین از نمونه‌های دیواره راه‌های هوایی: چاهک (M) شاخص اندازه مولکولی 100bp (غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر)، چاهک ۱ تا ۵ شامل باند 190bp ژن بتاکتین نمونه‌های کنترل و چاهک‌های ۶ تا ۱۰ شامل نمونه‌های بیماران شیمیایی می‌باشد. نتایج نشان‌داد که تغییری در میزان بیان این ژن در بین دو گروه کنترل و بیمار وجود ندارد.

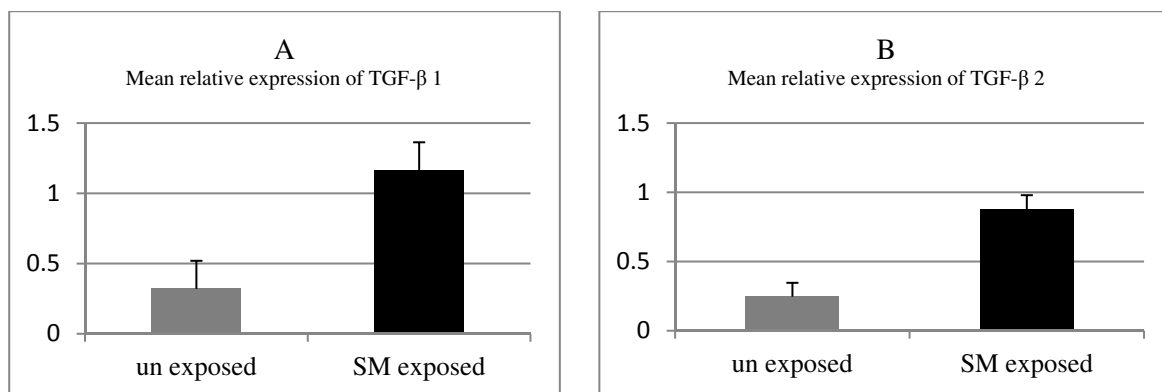
#### بحث

هدف از این تحقیق جداسازی مستقیم سلول‌های فیبروبلاست راه‌هوایی از نمونه‌های بیوپسی ریه، به منظور مطالعه اثرات مخرب گاز سولفوموستارد بر مجاری هوایی و میزان بیان ایزوفرم‌های یک و دو TGF- $\beta$  در سلول‌های فیبروبلاست جداسازی شده بود. امروزه تمرکز آزمایشات *in vitro* بر روی درک

آنالیز آماری مقایسه بیان ایزوفرم‌های TGF- $\beta$ 1 و TGF- $\beta$ 2 در دو گروه بیماران شیمیایی و کنترل برای مقایسه بیان این دو ژن در بین دو گروه از آزمون T مستقل استفاده شد. نتایج حاکی از این بود که بیان TGF- $\beta$ 1 و TGF- $\beta$ 2 به طور معنی‌داری در گروه مصدومین شیمیایی افزایش یافته است ( $p < 0.05$ ).

ساخت cDNA، بیان ژن‌های موردنظر در سطح mRNA توسط روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی‌ها نشان دادند که ایزوفروم‌های TGF- $\beta$ 1 و TGF- $\beta$ 2، در سطح mRNA در اکثر سلول‌های فیبروبلاست نمونه‌های هر دو گروه بیان می‌شوند. از آنجا که روش استفاده شده در این مرحله به صورت نیمه کمی بود، امکان مقایسه میزان بیان را بین گروه‌های مختلف فراهم می‌کند. بررسی‌های آماری نشان می‌دهد که بیان ژن‌های TGF- $\beta$ 1 و TGF- $\beta$ 2 به طور معنی‌داری در نمونه‌های جانبازان شیمیایی در سطح mRNA به نسبت نمونه‌های کنترل افزایش می‌یابد.

مکانیسم‌های بیوشیمیایی آسیب‌های ناشی از سولفوموستارد با هدف توسعه اقدامات پزشکی به منظور درمان و پیشگیری از این آسیب‌های می‌باشد (۱۹). در این مطالعه بیوپسی از راه‌های هوایی جانبازان شیمیایی گرفته‌شد و با کمک تکنیک‌های کشت سلولی سلول‌های فیبروبلاست از بافت بیوپسی جداسازی و کشت داده‌شد، RNA این سلول‌ها استخراج شد و بیان ژن‌های TGF- $\beta$ 1 و TGF- $\beta$ 2 در دو گروه مصدومین شیمیایی و افراد کنترل مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی بیان این ژن‌ها در گروه‌های مربوطه، پس از اطمینان از روش‌های بکار رفته جهت استخراج RNA و



شکل ۳. میانگین شدت نسبی بیان ژن TGF- $\beta$  1 و TGF- $\beta$  2 در نمونه‌های کنترل و بیمار. میانگین شدت نسبی بیان TGF- $\beta$  1 در دو گروه (گروه کنترل غیرشیمیایی و گروه شیمیایی) در نمودار A و نمودار B میانگین شدت نسبی بیان TGF- $\beta$  2 در دو گروه نشان می‌دهد. اندازه‌گیری در هر نمونه به صورت نسبت شدت باند ژن مورد نظر به  $\beta$ -actin می‌باشد. با استفاده از آزمون مستقل T مشخص شد که بیان این در گروه بیمار به طور معنی‌داری افزایش یافته‌است ( $p < 0.05$ ).

توجه قرار گرفت (۲۵). در این بیماری در کنار افزایش لایه کلاژن، عروق و بافت الاستیک در دیواره راه‌هوایی عمدتاً در میزان ماتریکس خارج سلولی نیز افزایش قابل ملاحظه‌ای مشاهده می‌شود که احتمالاً به علت افزایش سنتز و ترشح و یا کاهش حذف توسط سلول‌های فیبروبلاست و سایر سلول‌های ساختاری راه‌های هوایی می‌باشد (۲۶).

بررسی‌های مختلف نشان داده‌است که TGF- $\beta$  را می‌توان به عنوان یک هدف درمانی موثری در نظر گرفت، به طوری که در مطالعات *in vitro* نشان داده شده‌است مهار TGF- $\beta$  منجر به کاهش تجمع ماتریکس خارج سلولی و بهبود علائم فیروز می‌شود. TGF- $\beta$  به عنوان یک سایتوکاین مهم در پیشرفت فرایند تغییر ساختار راه‌هوایی در بیماری‌های مختلف ریوی، شناخته

تماس با گاز خردل منجر به عوارض زودرس و دیررس می‌شود که نارسائی‌های ریوی مهمترین عارضه ثانویه بوده و عامل اصلی ناتوانی و مرگ و میر در مصدومین مسموم‌شده با گاز خردل می‌باشد (۲۲-۲۰). مطالعات نشان می‌دهد که در این افراد، قطور شدن دیواره برونش‌ها، آمفیزم و فیبروزه شدن بافت‌های ریوی ناشی از آسیب وارده توسط سولفورموستارد است (۲۳). تغییر در ساختار مورفولوژیکی راه‌های هوایی به دنبال استنشاق گاز خردل در جانبازان شیمیایی با عارضه مزمن انسدادی راه‌های هوایی<sup>۱</sup> (COPD) دیده می‌شود (۲۴). تغییر ساختار راه‌هوایی برای اولین بار ۷۵ سال پیش توسط هوبر در طی مطالعه و توصیف آسم کشنده، مورد

<sup>۱</sup> chronic obstructive pulmonary disease

گزارش کرده‌اند. در این بیماری نیز تغییر ساختار وسیعی در مجاری هوایی رخ می‌دهد که به نوبه خود منجر به ضخیم‌شدن دیواره‌های مجاری هوایی و تنگی نفس می‌شود (۲۷ و ۳۷). در مطالعه دیگری که توسط Torrego و همکاران با استفاده از تکنیک ایمونوهیستوشیمی انجام شد مشخص شد که میزان پروتئین TGF- $\beta$ 2 به همراه TGF- $\beta$ 1 در ریه بیماران مبتلا به آسم بعد از مواجهه با آلرژن به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد که بیانگر نقش این ایزوفرم‌ها در بیماری آسم است (۳۸). مطالعه ما نیز این پیشنهاد را می‌کند که TGF- $\beta$ 1 و TGF- $\beta$ 2 نقشی مهمی در بیماری‌های مزمن ریوی مسدومین شیمیائی بازی می‌کند. Takizawa و همکاران با استفاده از تکنیک نیمه کمی RT-PCR و ایمونو هیستوشیمی افزایش بیان ژن TGF- $\beta$ 1 را در بیوپسی‌های اپی‌تلیالی افراد سیگاری و افراد مبتلا به بیماری انسداد مزمن ریه (COPD) نشان دادند (۳۹).

#### نتیجه‌گیری

مطابق با نتایج مطالعات ذکر شده که نشان‌دهنده افزایش میزانبیان ژن و پروتئین TGF- $\beta$ 1 و TGF- $\beta$ 2 در مسدومین شیمیائی می‌باشد، در مطالعه ما نیز مشخص شد که میزان رونوشت‌های TGF- $\beta$ 1 mRNA و TGF- $\beta$ 2 در سلول‌های فیبروبلاست جداسازی شده از بیوپسی‌های ریه مسدومین افزایش می‌یابد. این مطالعات نشان می‌دهد که TGF- $\beta$  علاوه بر نقش بسیار مهمی که در بیماری‌های ریه دارد در بیماری ریوی مسدومین نیز دخالت دارد و این سیتوکین را می‌توان به عنوان هدف بالقوه‌ای برای درمان با مواد ضد سیتوکین در نظر گرفت.

شده‌است (۲۷). در مطالعات مختلف انجام شده در شرایط *in vitro* و *in vivo* نقش TGF- $\beta$ 1 در افزایش بیان ژن‌های فیبروتیک مانند کلاژن و فاکتور رشد بافت همبند (CTGF)، در سلول‌های گوناگون نشان داده شده است (۲۸). Bergmann و همکاران (۱۹۹۸) با روش RT-PCR نیمه کمی نشان دادند که رونوشت‌های mRNA مربوط به TGF- $\beta$ 1 در سلول‌های مایع BAL بیماران برونشیت انسدادی حاصل از پیوند ریه در مقایسه با افراد کنترل افزایش می‌یابد (۲۹). علاوه بر این Batra و Vignola و همکارانشان در مطالعات جداگانه نشان دادند که افزایش TGF- $\beta$  در مایع برونشوی آئونولی (BAL) بیماران مبتلا به آسم و افزایش بیان TGF- $\beta$ 1 در سطح اپی‌تلیوم و لایه ساب‌موکوزال دیواره راه‌هوایی، وابسته به ضخامت غشاء پایه است و نشان‌دهنده نقش مستقیم TGF- $\beta$ 1 در تغییر ساختار راه‌هوایی می‌باشد (۳۰ و ۳۱). El-Gamel و همکاران با استفاده از روش ایمونو هیستوشیمی افزایش بیان TGF- $\beta$  را در نمونه‌های ریوی مبتلایان به همین بیماری نشان داده‌اند اما در این بررسی نوع ایزوفرم افزایش یافته مشخص نشده است (۳۲). علاوه بر این مطالعات، در مدل‌های حیوانی بیماری برونشیت انسدادی نیز اهمیت مسیر پیام‌رسانی TGF- $\beta$  مشخص شده‌است (۳۳ و ۳۴).

در دو مطالعه Coker و همکاران بیان TGF- $\beta$ 1 را در نمونه‌های ریه افراد سالم نشان داده‌اند و در مطالعه دوم انجام شده توسط این گروه مشخص شد که بیان TGF- $\beta$ 1 در بیماران فیبروز ریه افزایش یافته و در ایجاد بیماری دخیل می‌باشد (۳۵ و ۳۶) این یافته‌ها با نتایج مطالعه ما همخوانی دارند.

Anthony و همکاران افزایش میزان پروتئین TGF- $\beta$ 1 را مایع برونشوی آئونولی (BAL) بیماران مبتلا به آسم

## منابع

- 1- Balali-Mood M, et al. Chronic health effects of sulphur mustard exposure with special reference to Iranian veterans. *Emerging Health Threats Journal*, 2008.
2. Kehe K and Szinicz L, Medical aspects of sulphur mustard poisoning toxicology. 2005. 214(3): p. 198-209
3. Nourani MR, Yazdani S, Habibi Roudkenar M, Ebrahimi M, Halabian R, Mirbagheri L, Ghanei M and Imani Fooladi A A. HO1 mRNA and Protein do not Change in Parallel in Bronchial Biopsies of Patients after long term exposure to Sulfur Mustard. *Gene Regulation and Systems Biology*, 2010, 4, 83–90.
4. Nourani MR, Majid Ebrahimi, Mehryar Habibi Roudkenar, Ensieh Vahedi, Mostafa Ghanei, Abbas Ali Imani Fooladi. Sulfur Mustard Induces the Expression of Metallothionein-1A in Human Airway Epithelial Cells. *International Journal of General Medicine* 2011 (under press)
5. Ghanei M, et al. Effect of gamma interferon on lung function of mustard gas exposed patients, after 15 years. *Pulm Pharmacol Ther.* 2006; 19(2):148–53.
6. Aghanouri R, et al, Fibrogenic cytokine levels in bronchoalveolar lavage aspirates 15 years after exposure to sulfur mustard. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 287(6): p. L1160-4.
7. Khateri S, et al, 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): p. 1136-43.
8. Blobel, G.C., W.P. Schiemann, and H.F. Lodish, Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med*, 2000. 342(18): p. 1350-8.
9. Bassols, A. and J. Massague, Transforming growth factor beta regulates the expression and structure of extracellular matrix chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem*, 1988. 263: p. 3039-3045.
10. Sanford, L., I. Ormsby, and A.G.-d. Groot, TGF- $\beta$ 2 knockout mice have multiple developmental defects that are nonoverlapping with other TGF- $\beta$  knockout phenotypes. *Development* 1997. 124: p. 2659-70.
11. Moore B, Murphy RF, Agrawal DK. Interaction of  $\text{tgf-}\beta$  with immune cells in airway disease. *Curr Mol Med*. 2008;8(5):427-36
12. Hudon C, Turcotte H, Laviolette M, Carrier G, Boulet LP. Characteristics of bronchial asthma with incomplete reversibility of airflow obstruction. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997; 78:195-202.
13. Brewster CEP, Howarth PH, Djukanovic R, Wilson J, Holgate ST, Roche WR. Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990; 3:507-11.
14. Christina C. Lewis, et al. Airway fibroblasts exhibit a synthetic phenotype in severe asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Volume 115, Issue 3, Pages 534-540, 2005.
15. Phan SH. Fibroblast phenotypes in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29:S87–S92
16. Ihn H, Yamane K, Kubo M, Tamaki K. Blockade of endogenous transforming growth factor signaling prevents up-regulated collagen synthesis in scleroderma fibroblasts: association with increased expression of transforming growth factor  $\alpha$  receptors. *Arthritis Rheum* 2001;44:474–480
17. Phan SH. The myofibroblast in pulmonary fibrosis. *Chest* 2002; 122:286S–289S.
18. Bergeron C, Tulic M.K, Hamid Q, Tools used to measure airway remodeling in research. *Eur Respir J* 2007; 29: 596-604.
19. Claudia L, Henemyre-Harris CL, Adkins AL, Chuang AH, Graham JS. Addition of Epidermal Growth Factor Improves the Rate of Sulfur Mustard Wound Healing in an In Vitro Model. *Eplasty*, 2008 Mar 26; 8:e16.
20. Ghanei M et al, Tracheobronchomalacia and air trapping following mustard gas exposure. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006. 173: p. 304-309.
21. Ghanei M, et al, Bronchiolitis obliterans following exposure to sulfur mustard: chest high resolution computed tomography. *Eur J Radiol*, 2004. 52(2): p. 164-9.
22. Ghanei M, et al, High Resolution Computerized Tomography of Chest in Patients Exposed to Sulfur Mustard. *Iran. J. Radiol*, 2003.
23. Beheshti J, Marka E J, Akbaei H M H, Aslani J, Ghanei M, Mustard lung secrets: Long term clinicopathological study following mustard gas exposure. *Pathology. Research and Practice*, 202: pp. 739–744 2006.
24. Naghibi MR, Sulfur mustard intoxication, oxidative stress, and antioxidants. *Mil. Med. Jul*; 167(7):573-5 2002 Review.
25. Huber H and Koessler K. The pathology of bronchial asthma. *Arch Intern Med* 30: 689–760, 1922.
26. Brent E. McParland,1 Peter T. Macklem,2 and Peter D. Pare 1 Airway Hyperresponsiveness: From Molecules to Bedside Invited Review: Airway wall remodeling: friend or foe? *J Appl Physiol* 95: 426–434, 2003
27. Boxall, C., S.T. Holgate, and D.E. Davies, The contribution of transforming growth factor- $\beta$  and epidermal growth factor signalling to airway remodelling in chronic asthma. *European Respiratory Journal*, 2005. 27: p. 208-229.

28. Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J* 2004;18:816–827.
29. Bertelli, R., et al., Cell-specific regulation of alpha1 (III) and alpha2 (V) collagen by TGF-beta1 in tubulointerstitial cell models. *Nephrol. Dial. Transplant*, 1998. 13: p. 573-579.
30. Batra V, Musani AI, Hastie AT, Khurana S, Carpenter KA, Zangrilli JG, Peters SP. Bronchoalveolar lavage fluid concentrations of transforming growth factor (TGF)-beta1, TGF-beta2, interleukin (IL)-4 and IL-13 after segmental allergen challenge and their effects on alpha-smooth muscle actin and collagen III synthesis by primary human lung fibroblasts. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:437–444.
31. Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, Merendino A, Pace E, Rizzo A, la Rocca AM, Bellia V, Bonsignore G, Bousquet J. Transforming growth factor-beta expression in mucosal biopsies in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:591–9.
32. El-Gamel, A., et al., Transforming growth factor beta (TGF-) and obliterative bronchiolitis following pulmonary transplantation - downregulation of TGF-beta and procollagen I and III gene expression. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 1999. 18: p. 828-837
33. Aris, R., et al., Growth factor upregulation during obliterative bronchiolitis in the mouse model. *Am J Respir Crit Care Med* 2002. 166: p. 417-22.
34. Ramirez, A.M., et al., Smad3 Deficiency Ameliorates Experimental Obliterative Bronchiolitis in a Heterotopic Tracheal Transplantation Model. *Am J Pathol*, 2004. 165: p. 1223-1232.
35. Coker, R., G. Laurent, and S. Shahzeidi, Diverse cellular TGF $\beta$ 1 and TGF $\beta$ 3 gene expression in normal human and murine lung. *Eur Respir J*, 1996. 9: p. 2501-7.
36. Coker, R.K., et al., Localisation of transforming growth factor beta1 and beta 3 mRNA transcripts in normal and fibrotic human lung. *Thorax*, 2001. 56: p. 549-556.
37. Anthony, E., et al., Transforming Growth Factorb1 in Asthma. Measurement in Bronchoalveolar Lavage Fluid. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997. 156: p. 642–647.
38. Torrego, A., et al., Expression and activation of TGF- $\beta$  isoforms in acute allergeninduced remodelling in asthma. *Thorax* 2007. 62: p. 307-313.
39. Hajime, T., et al., Increased Expression of Transforming Growth Factorb 1 in Small Airway Epithelium from Tobacco Smokers and Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *Am J Respir Crit Care Med*, 2001. 163: p. 1476–1483.