



# CXCL10 Gene Expression in the Lung Tissue of Sulfur Mustard-Exposed Patients with Long-Term Pulmonary Complications

## ARTICLE INFO

### Article Type

Original Research

### Authors

Nikounezhad M.<sup>1</sup> BSc,  
Ghazanfari T.\* PhD,  
Askari N.<sup>2</sup> PhD,  
Zarnani A.H.<sup>3</sup> PhD,  
Gohari Moghaddam K.<sup>4</sup> PhD,  
Mirafsharieh A.<sup>5</sup> PhD

### How to cite this article

Nikounezhad M, Ghazanfari T, Askari N, Zarnani AH, Gohari Moghaddam K, Mirafsharieh A. CXCL10 Gene Expression in the Lung Tissue of Sulfur Mustard-Exposed Patients with Long-Term Pulmonary Complications. Iranian Journal of War & Public Health. 2015;7(1):35-42.

\*Immunoregulation Research Center, Shahed University, Tehran, Iran

<sup>1</sup>Immunology Department, Medicine Faculty, Shahed University, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Biology Department, Basic Sciences Faculty, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran

<sup>3</sup>Ibn-e-Sina Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>4</sup>Pulmonary Disease Department, Medicine Faculty, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>5</sup>Pathology Department, Medicine Faculty, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

### Correspondence

Address: Immunoregulation Research Center, 4th Floor, Shahed University Research Centers Building, No. 1471, Corner of Mehr Alley, North Karegar Street, Enqelab Square, Tehran, Iran

Phone: +98 2166418216

Fax: +98 2166419752

tghazanfari@yahoo.com

### Article History

Received: August 5, 2014

Accepted: August 25, 2014

ePublished: February 19, 2015

## ABSTRACT

**Aims** Mustard gas is an alkalizing substance that can lead to damage to DNA and intracellular enzymes. The aim of this study was to investigate the expression of CXCL10 in chemically-injured veterans' lung tissue.

**Materials & Methods** This case-control study was done on 16 lung paraffin blocks of individuals exposed to mustard gas and 7 lungs paraffin blocks not-exposed people as control group and with similar chronic pulmonary disorders in 2014. Real-Time PCR technique was used to measure CXCL10 expression in lung tissue. To measure the relative expression of genes CT Delta method was used. Data were analyzed using SPSS 20 software and Mann-Whitney test.

**Findings** Mean Delta CT of veteran samples was  $7.37 \pm 3.58$  and control group was  $5.81 \pm 3.29$  and no significant difference was observed between 2 groups and between exposed and non-exposed subgroups ( $p > 0.05$ ). CXCL10 gene expression pattern was same in exposed and not-exposed group with similar pulmonary pathology.

**Conclusion** The level and pattern of CXCL10 expression is not different in lung tissue of two exposed and not-exposed with similar pulmonary pathology groups.

**Keywords** Mustard Gas; Chemokine CXCL10; Genes; Lung

## CITATION LINKS

[1] Mustard gas exposure and carcinogenesis of ... [2] Skin manifestations of ... [3] Agents of chemical ... [4] The chronic effects of ... [5] Long-term effects of ... [6] Toxicodynamics of ... [7] Studies of mode of ... [8] Inflammatory effects of inhaled sulfur mustard in rat ... [9] Molecular and cellular mechanism of lung injuries due to exposure to sulfur mustard: A ... [10] The diversity of the effects of sulfur mustard gas inhalation on respiratory system 10 years after a single, heavy exposure analysis of 197 ... [11] Pathologic manifestations of ... [12] Pulmonary complications of ... [13] Inhalation of sulfur mustard causes long-term T cell-dependent inflammation: possible role of Th17 cells in ... [14] Sulfur mustard-induced pulmonary ... [15] Mini-review series: Focus on ... [16] Chemokines and chemokine receptors ... [17] Understanding the immunoangiostatic CXC chemokine ... [18] CXC chemokines in ... [19] Chemokines and cell migration in ... [20] The role of CXC chemokines in ... [21] Immunopathogenesis of chronic ... [22] Pathogenesis of chronic obstructive ... [23] Role of airway epithelium-origin chemokines and ... [24] Chemotaxis, chemokine receptors and ... [25] The role of chemokines and cytokines in ... [26] Synergy of IL-27 and TNF- $\alpha$  in regulating CXCL10 expression in ... [27] Regulation of pulmonary fibrosis by ... [28] CXCL11 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via inhibition of vascular ... [29] Inhibition of pulmonary fibrosis by ... [30] Long-term exposure of chemokine CXCL10 causes ... [31] CXCR3/CXCL10 interactions in the development of hypersensitivity ... [32] Alterations in the serum levels of ... [33] Alterations in serum levels of ... [34] Alterations in the serum levels of soluble L, P and ... [35] Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative ... [36] Clinical review of mustard ... [37] COPD Due to Sulfur Mustard ... [38] Highly sensitive C-reactive protein levels in Iranian patients with ... [39] Interleukin-6 and airflow ... [40] Long-term pulmonary complications in ... [41] Correlation of sulfur ... [42] CXCR3 and its ligands in a murine model of obliterative bronchiolitis: regulation and ... [43] Anthracosis in the lungs and ... [44] Pentoxifylline attenuates cigarette ... [45] CXCR3 and CCR5 chemokines in ... [46] CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with ... [47] Increased expression of the chemokine receptor CXCR3 ...

## میزان بیان ژن CXCL10 در بافت ریه مصدومان شیمیایی مواجهه یافته با گاز خردل مبتلا به عوارض تاخیری ریه

مریم نیکونژاد BSc

گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

طوبی غضنفری\* PhD

مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

نیره عسکری PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران

امیرحسین زرنانی PhD

مرکز تحقیقات این‌سینا، دانشکده علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

کیوان گوهری مقدم PhD

گروه داخلی ریه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

عباس میرافشاریه PhD

گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

### چکیده

**اهداف:** گاز خردل ماده‌ای آلکیل‌کننده است که توانایی آسیب به DNA و آنزیم‌های داخل سلولی را دارد. هدف از این مطالعه بررسی میزان بیان ژن CXCL10 در بافت ریه جانبازان شیمیایی بود.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه مورد-شاهدی در سال‌های ۹۳-۱۳۹۲ روی ۱۶ بلوک پارافینه ریه افراد مواجه با گاز خردل و ۷ بلوک پارافینه ریه افراد غیرمواجه به‌عنوان گروه کنترل و دارای اختلالات ریوی مزمن با شمای پاتولوژیک مشابه انجام گرفت. میزان بیان CXCL10 در بافت ریه با تکنیک ریل‌تایم PCR اندازه‌گیری شد. برای سنجش نسبی بیان ژن‌ها از روش موسوم به دلتا CT استفاده شد. نتایج به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS 20 و آزمون من-ویتنی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

**یافته‌ها:** میانگین دلتا CT نمونه‌های جانبازان  $7/37 \pm 2/58$  و نمونه‌های کنترل  $5/81 \pm 3/29$  بود که اختلاف معنی‌داری بین ۲ گروه و نیز بین زیرگروه‌های مواجه و غیرمواجه مشاهده نشد ( $p > 0/05$ ). الگوی بیان ژن CXCL10 در گروه‌های مواجه و غیرمواجه با اختلالات پاتولوژیک ریوی مشابه، یکسان بود.

**نتیجه‌گیری:** میزان و الگوی بیان ژن CXCL10 در بافت‌های ریه در افراد مواجه و غیرمواجه با گاز خردل با شمای پاتولوژیک مشابه تفاوتی ندارد.

**کلیدواژه‌ها:** گاز خردل؛ کموکاین CXCL10؛ ژن‌ها؛ ریه

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۵/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۶/۰۳

\*نویسنده مسئول: tghazanfari@yahoo.com

### مقدمه

گاز خردل، در جنگ عراق علیه ایران، به‌عنوان سلاح جنگی مورد استفاده قرار گرفت و موجب مصدومیت رزمندگان و مردم برخی شهرهای مرزی ایران مانند سردشت شد<sup>[1,2]</sup>. گاز خردل ماده‌ای آلکیل‌کننده است که توانایی آسیب به DNA و آنزیم‌های داخل سلولی را داشته و نیز پاسخ‌های التهابی را القا می‌کند. عوارض حاد ناشی از مواجهه با این گاز در همان هفته اول و عوارض تاخیری آن ۱۰ تا ۱۵ سال بعد و حتی در سال‌های طولانی‌تر پس از ضایعه اولیه خود را نشان می‌دهند<sup>[3,4]</sup>. دستگاه تنفس یکی از مهم‌ترین اندام‌هایی است که تحت عوارض ناشی از استنشاق گاز خردل قرار می‌گیرد. استنشاق این گاز موجب فعال شدن پاسخ‌های ایمنی در ریه می‌شود<sup>[5-8]</sup>. مطالعات متعدد روی عوارض دیررس ریوی ناشی از گاز خردل در مصدومین شیمیایی نشان‌دهنده طیف گسترده‌ای از بیماری‌های تنفسی مانند بیماری انسدادی مزمن ریه (COPD)، برونشیت انسدادی و تنفسی، آمفییزم، برونشکتازی، فیبروز، برونشولیت انسدادی (Constrictive Bronchiolitis) و حتی تحریک‌پذیری راه‌های هوایی است<sup>[6,9-12]</sup>.

تاکنون مکانیسم دقیق ایجاد عوارض تاخیری ریه توسط گاز خردل در مصدومین شیمیایی شناخته نشده است<sup>[13]</sup>. اما مهم‌ترین عوارض پاتولوژیک تاخیری که در ریه مواجهه‌یافته‌گان با گاز خردل گزارش شده، COPD و برونشولیت مزمن است که البته از نظر ویژگی‌های بالینی با نوع معمول آنها تفاوت دارند. برخی پژوهشگران عوارض تاخیری ریوی ناشی از گاز خردل را "ریه خردلی" نامیده‌اند. مطالعات مختلف روی مصدومین شیمیایی با عوارض دیررس ریه نشان می‌دهند، عوامل موثر در پاتولوژی برونشولیت مزمن، COPD و فیبروز تنفسی ایدیوپاتیک می‌توانند در ایجاد عوارض تاخیری ریه جانبازان شیمیایی نیز نقش داشته باشند<sup>[9]</sup>. بسیاری از این عوارض به‌دلیل حضور و فعالیت سلول‌های التهابی در بافت ریه ایجاد می‌شوند<sup>[9,14]</sup>.

CXCL10 که همچنین به IP-10 نیز معروف است، از خانواده کموکاین‌های ELR-CXC است. کموکاین‌ها خانواده بزرگی از سایتوکاین‌ها هستند که قادر به تحریک لکوسیت‌ها و مهاجرت آنها از خون به درون بافت هستند<sup>[15,16]</sup>. کموکاین‌های زیرگروه "CXC" یا "α" بر اساس وجود یا فقدان تری‌پپتید Glu-Leu-Arg در انتهای N خود به ۲ زیرگروه کموکاین‌های ELR+CXC (رگز) و کموکاین‌های ELR-CXC (ضد‌رگزایی) تقسیم می‌شوند. CXCL10 از جمله کموکاین‌های ELR است که رگزایی را مهار می‌کند و در ایمنی اکتسابی نقش دارد<sup>[17-20]</sup>.

CXCR3 گیرنده CXCL10 است که بر سطح سلول‌های Th فعال شده، Tc، NK و سلول‌های B فعال شده بیان می‌شود. CXCL10، با اتصال به گیرنده خود سلول هدف را به کانون التهاب فرا می‌خواند. این کموکاین در پاسخ سلول‌ها به

یافته است و نیز سطح سرمی سلکتین‌های محلول P و L کاهش و E افزایش داشته است [34, 33].

با توجه به تغییرات مشاهده شده در فاکتورهای التهابی نظیر کموکاین‌ها و نیز با توجه به اینکه نقش CXCL10 در ایجاد عوارض پاتولوژیک در بیماری‌های التهابی مزمن ریه مانند برونشیت انسدادی، فیروز و COPD اثبات شده است و این مولکول و گیرنده آن از اهداف دارویی در درمان بیماری‌های ریوی هستند، در این پژوهش، میزان بیان ژن CXCL10 در بافت ریه جانبازان شیمیایی مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

این مطالعه مورد-شاهدی در سال‌های ۹۳-۱۳۹۲ در مصدومان شیمیایی مواجه با گاز خردل با مشکلات ریوی که از ریه آنها برای اهداف تشخیصی با روش برونکوسکوپي مستقیم در سال‌های قبل نمونه‌گیری شده بود و بلوک‌های پارافینه بافت ریه آنها در آرشیو پاتولوژی بیمارستان‌های سرتاسر ایران موجود بود، انجام شد. از بین آرشیو بافت‌های پارافینه جانبازان ۱۶ بلوک پارافینه طبق ویژگی‌های مدنظر برای سنجش میزان بیان CXCL10 در بافت ریه انتخاب شدند. در مورد گروه غیرمواجه (کنترل) نیز این نمونه‌ها از آرشیو بیمارستان‌ها تهیه شدند. از بین افراد غیرمواجهی که به منظور تشخیص بیماری ریوی نمونه‌گیری شده و از نظر سن و جنسیت با گروه مورد مطالعه مطابق بودند، ۷ بلوک پارافینه انتخاب شد. به منظور تایید تشخیص پاتولوژی قبل و اثبات عدم حضور سلول‌های سرطانی، لام رنگ آمیزی هماتوکسیلین/ئوزین بلوک‌ها توسط متخصص پاتولوژی ریه دیده شد و بر اساس تشخیص پاتولوژی نهایی ۳ گروه، برونشیت انسدادی و تنفسی و آنتراکوزیز (Anthraxosis) انتخاب شدند. بر این اساس مواجه به ۲ گروه تقسیم شدند. ۹ نمونه در گروه برونشیت انسدادی و ۷ نمونه نیز در برونشیت تنفسی قرار گرفتند. گروه غیرمواجه نیز بر این اساس به ۳ گروه برونشیت انسدادی، تنفسی و آنتراکوزیز تقسیم شد که به ترتیب در گروه اول ۳ نمونه، گروه دوم ۱ نمونه و در گروه سوم ۳ نمونه قرار گرفتند. نمونه‌های جانبازان مواجه و گروه غیرمواجه از مواردی که بافت ریه و پرونده آنها توسط متخصصان پاتولوژی و فوق تخصص ریه بررسی شده بود، انتخاب شدند. معیارهای ورود به مطالعه مواجهه قطعی با گاز خردل بر اساس پرونده پزشکی بنیاد شهید و ایثارگران، وجود مشکل ریوی بر اساس پرونده پزشکی، جنسیت مذکر و سن ۳۰ تا ۶۰ سال بود. معیارهای خروج از مطالعه از دست رفتن نمونه، کافی نبودن میزان بافت و حضور سلول‌های سرطانی در بافت بودند.

استخراج RNA از نمونه‌های پارافینه با استفاده از کیت "استخراج RNA از بافت پارافینه" (Qiagen, Cat:73504; آلمان) صورت

اینترفرون‌های تیپ یک و دو که از سلول‌های مستقر در بافت مانند سلول‌های اپیتلیال یا مهاجر مانند T فعال شده و ماکروفاژ در بافت التهابی تولید می‌شوند، در نتیجه حضور T فعال در کانون التهاب با تولید IFN- $\gamma$  خود محرک تولید بیشتر IP-10 و ایجاد یک حلقه مثبت در فراخوانی سلول‌های T فعال است. همچنین، CXCL10 با دیگر سایتوکاین‌های Th1 مانند IL-2، IL-12، IL-15، IL-18 و IL-23 که منجر به تولید IFN- $\gamma$  می‌شوند نیز ارتباط دارد [19].

CXCL10، از جمله شناساگرهای موثر در پاتولوژی بیماری‌های ریوی مانند COPD، فیروز و برونشیت مزمن است. COPD با مسدود شدن پیشرونده مسیرهای هوایی (برونشیت مزمن) و تخریب الوئول‌های ریه (آمفیزم) همراه است. مسدود شدن مسیرهای هوایی در COPD می‌تواند به دلیل ضخیم و فیروز شدن راه‌های هوایی در نتیجه حضور سلول‌های التهابی (فیروبلاست‌ها، T<sub>H</sub>1 و CD8<sup>+</sup> و MQ) به دنبال یک التهاب مزمن در ریه باشد [20, 21]. در بافت ریه آسیب‌دیده در COPD سلول‌های اپیتلیال ریه و ماکروفاژهای الوئولار با ترشح کموکاین‌هایی مانند CXCL10 موجب فراخوانی سلول‌های التهابی به محل آسیب‌دیده و ایجاد یک کانون التهابی می‌کنند [22-24]. CXCL10 با اتصال به گیرنده خود بر سطح لنفوسیت‌های T فعال شده در فراخوانی سلول‌های T به ریه و تخریب دیواره الوئول‌ها و ایجاد آمفیزم نقش به‌سزایی دارد. CXCL10 در برونشیت مزمن علاوه بر فراخوانی سلول‌های T فعال شده با اتصال به CXCR3 بر سطح سلول‌های اپیتلیال مسیرهای هوایی موجب تکثیر بیش از حد این سلول‌ها و انسداد مسیرهای هوایی نیز می‌شود [24].

CXCL10، در فیروز نیز نقش مهمی دارد [25, 26]. فیروز یک بیماری تحدیدی ریوی است. مطالعات نشان می‌دهند در فیروز میزان کموکاین‌های ELR<sup>+</sup> مانند CXCL8 و CXCL5 که در رگ‌زایی نقش دارند در مقایسه با کموکاین‌های ELR<sup>-</sup> مانند CXCL10 و CXCL11 افزایش دارند [27, 28]. تجویز آگزوزن کموکاین‌های CXCL10 و CXCL11 می‌تواند ایجاد فیروز در مدل‌های موش تضعیف کنند، در نتیجه کموکاین‌های جلوگیری‌کننده از رگ‌زایی مانند CXCL10 می‌تواند از اهداف درمانی برای جلوگیری از پیشرفت فیروز باشند [29]. علاوه بر COPD و فیروز نقش CXCL10 در برونشیت مزمن، تحریک‌پذیری راه‌های هوایی و سل نیز اثبات شده است [30, 31].

سطح سرمی فاکتورهای CCL2/MCP1، کموکاین فراخوانی ماکروفاژها در مصدومین شیمیایی سردشت افزایش و میزان CCL5، IL-8/CXCL8 و RANTES کاهش یافته است [32]. همچنین در پژوهش یارایی و همکاران روی مصدومین شیمیایی سردشت، مشخص شده است که میزان سایتوکاین‌های التهابی شامل IL-1 $\beta$ ، IL-1 $\alpha$ ، IL-1Ra و TNF در این افراد کاهش

مرجع در تحلیل نتایج ریل تایم PCR (Real-Time PCR) با روش لیواک در نظر گرفته شد (شکل ۱). عملکرد پرایمرها قبل از انجام مراحل مطلوب سازی روی ریل تایم PCR با نمونه‌های مثبت سنجیده شد. واکنش ریل تایم PCR با استفاده از مستر میکس (Master Mix) حاوی رنگ SYBR Green I (TAKARA, ) (Cat No.: RR820L؛ ژاپن) و در دستگاه ریل تایم (Applied Biosystem؛ ایالات متحده) انجام گرفت. واکنش‌های ۲۰ میکرولیتری با ترکیب ۲/۵ میکرومتر محصول cDNA، یک میکرولیتر پرایمر رفت و یک میکرولیتر پرایمر برگشت با غلظت ۵ میکرومول برای CXCL10 و با غلظت ۱۰ میکرومول در واکنش ریل تایم PCR انجام شد. برای GAPDH، ۹/۶ میکرولیتر مستر میکس و ۴/۴ میکرولیتر راکس (Rox) برای یک چرخه با حرارت ۹۵°C در ۳۰ ثانیه، ۵۰ چرخه با حرارت ۹۵°C در ۵ ثانیه و سپس با ۵۰ چرخه با حرارت ۶۰°C در ۳۰ ثانیه انجام شد و بعد از پایان مراحل PCR، برنامه منحنی ذوب در دستگاه اجرا شد. مشاهده تنها یک قله در منحنی ذوب دیده، عدم وجود محصولات غیراختصاصی را تایید کرد.

برای سنجش نسبی بیان ژن‌ها از روش موسوم به دلتا CT (Delta CT) که اختلاف بین CT ژن هدف و یک ژن مرجع مقایسه مانند GAPDH است، استفاده شد. میزان دلتا CT با بیان ژن رابطه عکس دارد. این روش با فرض برابری بازدهی ژن مورد نظر و ژن مرجع مقایسه انجام می‌شود. برای محاسبه بازدهی از منحنی استاندارد و از غلظت‌های ۱ به ۵ cDNA کنترل برای تهیه منحنی استاندارد استفاده شد. اختلاف بازدهی واکنش PCR ژن هدف و ژن استاندارد نزدیک به یکدیگر بود [35].

نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS 20 و آزمون من-ویتنی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

## یافته‌ها

در زمان نمونه‌گیری، میانگین سنی گروه مواجه ۴۱/۹۵±۱۱/۱۳ سال و گروه غیرمواجه ۵۱/۰۲±۱۰/۰۷ سال بود. میانگین دلتا CT نمونه‌های جانبازان ۷/۳۷±۳/۵۸ و نمونه‌های کنترل ۵/۸۱±۳/۲۹ بود که اختلاف معنی‌داری بین ۲ گروه و نیز بین زیرگروه‌های مواجه و غیرمواجه مشاهده نشد (p>۰/۰۵). الگوی بیان ژن CXCL10 در گروه‌های مواجه و غیرمواجه با اختلافات پاتولوژیک ریوی مشابه، یکسان بود (شکل ۱).

## بحث

بعد از گذشت بیش از دو دهه از جنگ تحمیلی هنوز جانبازان شیمیایی از عوارض تاخیری ناشی از مواجهه با گاز خردل رنج می‌برند. سال‌ها پس از مواجهه با گاز خردل شایع‌ترین اختلال بین افراد مواجه مشکلات تنفسی است. این اختلالات در قربانیان گاز

گرفت. ابتدا ۲ برش ۱۸ میکرونی از بلوک تهیه شد و سپس با استفاده از زایلین در ۵۶°C، ۳۰ دقیقه پاراتین‌زدایی شد. برای خارج کردن زایلین، از الکل مطلق استفاده شد. پس از انکوباسیون یک شبه نمونه پاراتین‌زدایی شده با پروتئاز K در دمای ۴۵°C و سپس با عبور از ستون RNA رسوب داده شد. در نهایت، RNA رسوب داده شده در آب عاری از Rnase/Dnase حل شد. غلظت RNA استخراج شده با دستگاه نانودراپ (Thermo؛ ایالات متحده) اندازه‌گیری شد. برای اطمینان از عدم حضور DNA ژنومی از بین نمونه‌ها به شکل تصادفی تعدادی انتخاب شد و با محصول RNA استخراج شده مستقیماً و قبل از تبدیل شدن به cDNA با پرایمر بتا-اکتین با قابلیت اتصال به DNA ژنومی، ذکر شده واکنش PCR انجام شد (جدول ۱). به دلیل دیدن باند محصول روی ژل با PCR روی محصول RNA، مطابق پروتکل تیمار با DNase I (Fermentas, Cat: EN0521؛ ایالات متحده) انجام شد. به هر واکنش یک میکروگرم محصول RNA، ۲ میکرولیتر MgCl<sub>2</sub> همراه با ۱۰X میکرولیتر بافر و یک میکرولیتر DNase I/RNase-free اضافه و با اضافه کردن آب دارای DEPC (DEPC-treated Water) به حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر رسانده شد. نمونه‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در ۳۷°C انکوبه شدند و سپس به منظور توقف واکنش DNase I، ۵۰ میلی مول EDTA اضافه شد و ۱۰ دقیقه دیگر در ۵۶°C انکوبه شدند. مجدداً محصول RNA مجاور شده با DNase I با پرایمر ذکر شده، PCR شد. در نتیجه این PCR محصولی تولید نشد و از عدم حضور DNA ژنومی اطمینان حاصل شد. در ادامه از محصول RNA، cDNA سنتز شد.

با استفاده از کیت cDNA سازی (TAKARA؛ ژاپن)، RNA استخراج شده به cDNA تبدیل شد. برای سنتز cDNA، ۲ میکرولیتر مستر میکس 2X (TAKARA؛ ژاپن) با ۰/۵ میکرولیتر پرایمر الیگو و ۰/۵ میکرولیتر پرایمر تصادفی همراه با ۰/۵ میکرولیتر آنزیم ترانس کریپتاز معکوس و ۵۰ نانوگرم از محصول RNA در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷°C و برای توقف واکنش آنزیم ۵ ثانیه در ۸۵°C انکوبه شد. پرایمرها با استفاده از پایگاه اطلاعاتی NCBI طراحی شدند (جدول ۱).

جدول ۱) توالی پرایمرها

ژن	توالی پرایمر
CXCL10	For: 5'-CTGAGCCTACAGCAGAGGAAC-3' Rev: 5'-GAGAGTACTCCTTGAATGCCAC-3'
GAPDH	For: 5'-TTGCCCTCAACGACCACCTT-3' Rev: 5'-TGGTCCAGGGGTCTTACTCC-3'
β-actin	For: 5'-AACGGTGAAGGTGACAGCAGTCG-3' Rev: 5'-GGCAAGGGACTTCTGTAAACAACG-3'

با تغییر مقدار پرایمر و نمونه و تغییر در دمای اتصال پرایمر، شرایط مطلوب را برای واکنش به دست آمد. ژن GAPDH نیز به عنوان ژن

که به عنوان یک شناساگر شناخته شده در ایجاد عوارض ریوی مانند COPD و برونشیت است، در مصدومین شیمیایی و گروه غیرمواجه که اختلالات ریوی مشابه دارند، تفاوت معنی داری نداشت.

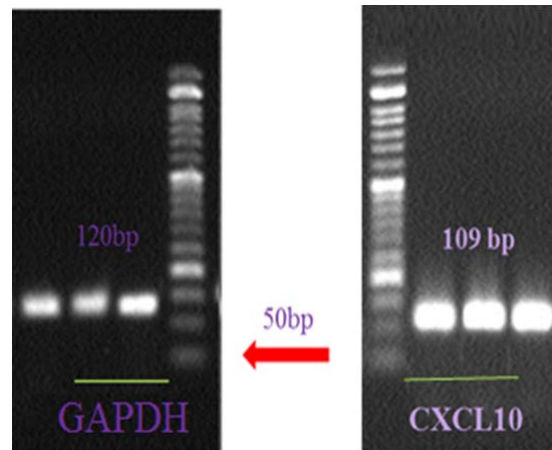
در مطالعه روی مصدومین شیمیایی سردشت مشخص شده است سطح سرمی فاکتورهای CCL2/MCP1 در این افراد افزایش و میزان CCL5، IL-8/CXCL8 و RANTES و همچنین IL-1 $\beta$ ، IL-1 $\alpha$  و TNF در این افراد کاهش دارد و نیز سطح سرمی سلکتین های محلول P و L کاهش و E افزایش داشته است [32، 34].

پژوهش حاضر با پژوهش های قبل روی جانبازان در دو نکته مهم تفاوت دارد. اول اینکه برخلاف پژوهش های قبلی که در سرم یا خلط انجام شده اند، این پژوهش در موضع دارای اختلال انجام شد و بیماران به شکل سیستمیک ارزیابی نشدند؛ دوم اینکه گروه کنترل در پژوهش های قبل سالم و در این مطالعه دارای اختلالات پاتولوژیک ریوی بودند. با توجه به نتایج حاصل از مجموع این پژوهش ها روی جانبازان شیمیایی به ویژه جانبازان دارای عوارض ریوی شدید سال ها پس از مواجهه شاید بتوان چنین فرض کرد که عوارض تاخیری ریه در مصدومین در مورد CXCL10 مشابه بعضی از عوارض ریوی است و رها شدن IFN- $\gamma$  از Th1 فعال شده با تحرک سلول های ماکروفاژ الوتولار و اپیتلیال ریه منجر به ترشح CXCL10 و فراخوانی بیشتر Th1 فعال و سلول های T به ریه می شود. نتایج با این فرض همخوانی دارد چرا که میزان بیان CXCL10 در گروه مواجه و غیرمواجه که هر دو عوارض پاتولوژیک مشابه داشتند، تفاوت معنی داری نداشت و در هر دو الگوی بیان یکسان بود.

پژوهش ها نشان می دهند که میزان بیان CXCL10 در ریه های که به سندرم برونشیت انسدادی مبتلا می شوند، افزایش دارد و نیز مطالعه روی در مدل موش ترانس ژن شده نشان داده است ریه سالم در صورتی که طولانی مدت در معرض CXCL10 قرار گیرد به دلیل مهاجرت سلول های T به ریه دچار التهاب و برونشیت می شود [30] و حتی در پژوهش نقش IFN- $\gamma$  و STAT1 در القای CXCL10، گیرنده آن، CXCR3 و ایجاد سندرم برونشیت انسدادی و ایسکمی اثبات شده است. این پژوهش نشان می دهد که مهار CXCL10 و گیرنده آن با هم از تخریب مسیرهای هوایی در سندرم برونشیت انسدادی جلوگیری می کند [42]. تفاوت معنی داری بین گروه مواجه یا غیرمواجه بیمار وجود نداشت که می تواند به دلیل عدم دسترسی به نمونه های کنترل نرمال برای مقایسه با گروه مواجه باشد.

در مطالعات آزمایشگاهی روی سل لاین ماکروفاژهای موشی و در موجود زنده روی مایع BAL و بافت ریه موش، میزان IFN- $\gamma$  در

خردل فیروز ریوی، COPD و برونشیت مزمن است [9]. طبق پژوهش انجام شده روی جانبازان شیمیایی مواجه با گاز خردل سطح سرمی کمو کاین CCL2/MCP1 که فراخواننده ماکروفاژهاست بالاتر از گروه کنترل گزارش شده است [32]. CXCL10 یکی از کمو کاین های مهم در فراخوانی سلول های T به بافت است. IFN- $\gamma$  و CXCL10 در کنار هم ایجاد یک حلقه مثبت برای فراخوانی سلول های T به بافت و ایجاد یک کانون التهابی مزمن می کنند [24]. پژوهش های متعدد نشان می دهند CXCL10 در بافت ریه در ایجاد عوارض پاتولوژیک ریوی مانند برونشیت مزمن، COPD و فیروز نقش دارد [27-32] و از آن جایی که عوامل موثر در پاتولوژی برونشیت مزمن، COPD و فیروز می توانند در ایجاد عوارض تاخیری ریه در جانبازان شیمیایی نیز نقش داشته باشند [37، 9] و نیز با توجه به اینکه در بررسی منابع موجود، تاکنون پژوهشی در رابطه با بررسی میزان بیان CXCL10 در ریه جانبازان شیمیایی با عوارض تاخیری ریوی گزارش نشده است؛ میزان بیان CXCL10 را در بافت ریه مصدومین شیمیایی با عوارض دیررس ریوی بررسی شد.



شکل ۱) باند CXCL10 و GAPDH بعد از انجام PCR روی cDNA ساخته شده از نمونه بافت

میزان بیان CXCL10 در جانبازان شیمیایی مواجه نسبت به گروه غیرمواجه تفاوت معنی داری نداشت. همچنین میزان بیان کمو کاین CXCL10 در زیرگروه های گروه مواجه شامل برونشیت انسدادی و برونشیت تنفسی با گروه غیرمواجه دارای اختلالات پاتولوژیک ریوی برونشیت انسدادی، تنفسی و آتراکوزیز مقایسه شد که در این مقایسه نیز تفاوت معنی داری مشاهده نشد.

مطالعات بالینی انجام شده روی مصدومین شیمیایی با عوارض تاخیری ریوی ناشی از گاز خردل، تشابه بعضی از عوارض ریوی این بیماران به بیماری های انسدادی مزمن ریه مانند برونشیت مزمن را نشان داده اند [38-41]. نتایج نشان داد که میزان بیان CXCL10

با توجه به عدم دسترسی به تعداد نمونه‌های بیشتر که با توجه به نقش و اهمیت CXCL10 پیشنهاد می‌شود این پژوهش با تعداد نمونه بیشتر تکرار شود و نیز از آن جایی که فرآیند بلوک‌گیری روی RNA بافت تاثیرگذار است و این پژوهش روی بلوک‌های پارافینه صورت گرفته است که در شرایط متفاوتی بلوک‌گیری شده بودند، پیشنهاد می‌شود میزان CXCL10 در نمونه‌هایی مانند خلط و مایع لاواژ برونکوالوئولار که می‌توانند نشان‌دهنده وضعیت بافت ریه باشند نیز انجام شود. با توجه به اینکه میزان بیان CXCL10 در گروه مواجه و غیرمواجه با اختلالات پاتولوژیک ریوی مشابه تفاوت معنی‌داری نداشت و با توجه به شرایط خاص التهابی جانبازان شیمیایی و نقش CXCL10 در پاسخ‌های التهابی، پیشنهاد می‌شود پژوهش‌های بیشتری برای بررسی ارتباط آن با شدت عوارض تاخیری و اندازه‌گیری سطح این کمکاین در بافت‌های مختلف آسیب‌دیده جانبازان به ویژه پوست و چشم صورت بگیرد.

### نتیجه‌گیری

میزان و الگوی بیان ژن CXCL10 در بافت‌های ریه در افراد مواجه و غیرمواجه با گاز خردل با شمای پاتولوژیک مشابه تفاوتی ندارد.

**تشکر و قدردانی:** از مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی که از نظر مالی این پژوهش را حمایت نموده‌اند تشکر می‌نمایم.

**تاییدیه اخلاقی:** این پژوهش در شورای اخلاق دانشگاه شاهد تصویب شده است.

**تعارض منافع:** موردی از طرف نویسندگان گزارش نشده است.

**منابع مالی:** توسط مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی تامین شده است.

### منابع

- 1- Hosseini-khalili A, Haines DD, Modirian E, Soroush M, Khateri S, Joshi R, et al. Mustard gas exposure and carcinogenesis of lung. *Mutat Res.* 2009;678(1):1-6
- 2- Momeni AZ, Enshaeih S, Meghdadi M, Amindjavaheri M. Skin manifestations of mustard gas. A clinical study of 535 patients exposed to mustard gas. *Arch Dermatol.* 1992;128(6):775-80.
- 3- Borak J, Sidell FR. Agents of chemical warfare: Sulfur mustard. *Ann Emerg Med.* 1992;21(3):303-8.
- 4- Rowell M, Kehe K, Balszuweit F, Thiermann H. The chronic effects of sulfur mustard exposure. *Toxicology.* 2009;263(1):9-11.
- 5- Razavi SM, Ghanei M, Salamati P, Safiabadi M. Long-term effects of mustard gas on respiratory system of Iranian veterans after Iraq-Iran war: A review. *Chin J Traumatol.* 2013;16(3):163-8.
- 6- Somani SM, Babu SR. Toxicodynamics of sulfur mustard. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol.* 1989;27(9):419-35.

مایع لاواژ برونکوالوئولار و نیز بیان CXCL10 و تعداد سلول‌های CXCR3<sup>+</sup> در بافت ریه افراد سیگاری نسبت به گروه کنترل سالم افزایش داشته است. همچنین، تاثیر داروی PTX در کاهش CXCL10 و IFN- $\gamma$  و سلول‌های CXCR3<sup>+</sup> نشان داده شده است<sup>[44]</sup>. نه تنها در مدل حیوانی بلکه پژوهش‌های انسانی نیز بالا بودن میزان CXCL10 و نیز نقش CXCL10 در ترافیک سلولی و افزایش سلول‌های CXCR3<sup>+</sup> مانند Th و Tc در ریه این بیماران را نشان داده‌اند. همچنین، نقش این سلول‌ها در رهاسازی اینترفرون گاما که محرک تولید CXCL10 است نیز اثبات شده است که این امر در بیماران مبتلا به برونشیت می‌تواند یکی از دلایل محدودیت راه‌های هوایی و اختلالات تنفسی باشد<sup>[45-47]</sup>. با توجه به اینکه الگوی بیان CXCL10 در نمونه‌های مواجه و غیرمواجه دارای عارضه برونشیت مشابه بود می‌توان گفت نتایج ما نیز از این یافته‌ها دور نیست.

از آن جایی که برونکوسکوپ و نمونه‌برداری مستقیم از ریه تنها در مراحل انتهایی تشخیص بیماری‌های ریوی و زمانی که پزشک با روش‌های غیرتهاجمی به تشخیص نمی‌رسد انجام می‌شود، علیرغم تمام تلاش ما برای جست‌وجوی بافت ریه نرمال نتوانستیم نمونه‌هایی با ویژگی‌های نرمال یا نزدیک به نرمال در آرشیو پاتولوژی بیمارستان‌ها پیدا کنیم و تنها بین بلوک‌هایی که به‌عنوان گروه غیرمواجه با اختلالات پاتولوژیک ریوی انتخاب شدند بلوک‌هایی با عارضه پاتولوژی آنتراکوزیز نزدیک‌ترین گروه به ریه نرمال هستند. آنتراکوزیز به شکل پلاک‌های سیاه در بافت ریه دیده می‌شود. این عارضه حاصل فاگوسیت ذرات کربن توسط ماکروفاژهای ریه است. در مراحل اولیه علائم تنفسی ندارد و در ساکنین شهرهای بزرگ به دلیل آلودگی هوا و نیز در کارگران معادن دیده می‌شود اما با این وجود زمینه‌های التهاب در ریه مبتلا به آنتراکوزیز دیده می‌شود<sup>[43]</sup> که در نتیجه نمی‌توان آنها را به‌عنوان کنترل سالم در نظر گرفت. این مهم در نتایج ما و اختلاف آنها با نتایج پژوهش‌های قبل بی‌شک نقش داشته است.

از جمله محدودیت‌ها در این پژوهش، دسترسی و جست‌وجوی نمونه‌های مناسب و منطبق بر شرایط پژوهش از بین آرشیو پاتولوژی بیمارستان‌ها بود که بسیار دشوار بود. در ضمن به دلیل قدیمی بودن بلوک‌ها، احتمال از بین رفتن فاکتورهای مد نظر در آنها می‌رفت. اما آزمایشات روی کیفیت RNA استخراجی نشان داد می‌توان از این نوع نمونه که بدون هیچ آسیبی به بیمار قابل دسترسی است، در پژوهش‌های دیگر نیز استفاده نمود. این پژوهش روی بلوک‌های موجود در آرشیو بیمارستان‌ها انجام گرفت، در نتیجه حذف متغیرهای تاثیرگذار در زمان نمونه‌گیری مانند داروهای که احتمالاً بیمار مصرف کرده است، از پژوهش غیرممکن بود که این امر نیز می‌تواند در نتایج تاثیرگذار بوده باشد.

- 27- Jiang D, Liang J, Hodge J, Lu B, Zhu Z, Yu S, et al. Regulation of pulmonary fibrosis by chemokine receptor CXCR3. *J Clin Invest*. 2004;114(2):291-9.
- 28- Burdick MD, Murray LA, Keane MP, Xue YY, Zisman DA, Belperio JA, et al. CXCL11 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via inhibition of vascular remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(3):261-8.
- 29- Tager AM, Kradin RL, LaCamera P, Bercury SD, Campanella GS, Leary CP, et al. Inhibition of pulmonary fibrosis by chemokine IP10/CXCL10. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004;31(4):395-404.
- 30- Jiang D, Liang J, Guo R, Xie T, Kelly FL, Martinu T, et al. Long-term exposure of chemokine CXCL10 causes bronchiolitis-like inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012;46(5):592-8.
- 31- Agostini C, Calabrese F, Poletti V, Marcer G, Facco M, Miorin M, et al. CXCR3/CXCL10 interactions in the development of hypersensitivity pneumonitis. *Respir Res*. 2005;22;6:20.
- 32- Ghazanfari T, Yaraee R, Kariminia A, Ebtekar M, Faghihzadeh S, Vaez-Mahdavi MR, et al. Alterations in the serum levels of chemokines 20 years after sulfur mustard exposure: Sardasht-Iran Cohort Study. *Int Immunopharmacol*. 2009;9(13-14):1471-6.
- 33- Yaraee R, Ghazanfari T, Ebtekar M, Ardestani SK, Rezaei A, Kariminia A, et al. Alterations in serum levels of inflammatory cytokines (TNF, IL-1alpha, IL-1beta and IL-1Ra) 20 years after sulfur mustard exposure: Sardasht-Iran cohort study. *Int Immunopharmacol*. 2009;9(13-14):1466-70.
- 34- Yaraee R, Ghazanfari T, Faghihzadeh S, Mostafaie A, Soroush MR, Inai K, et al. Alterations in the serum levels of soluble L, P and E-selectin 20 years after sulfur mustard exposure: Sardasht-Iran Cohort Study. *Int Immunopharmacol*. 2009;9(13-14):1477-81.
- 35- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
- 36- Ghanei M, Adibi I. Clinical review of mustard lung. *Iran J Med Sci*. 2007;32(2):58-65.
- 37- Lari SM, Attaran D, Towhidi M. COPD Due to Sulfur Mustard (Mustard Lung). In: Ong KCh. *Chronic Obstructive Pulmonary Disease - Current Concepts and Practice*. Croatia: InTech; 2012. Pp. 231-238.
- 38- Attaran D, Lari SM, Khajehdaluae M, Ayatollahi H, Towhidi M, Asnaashari A, et al. Highly sensitive C-reactive protein levels in Iranian patients with pulmonary complication of sulfur mustard poisoning and its correlation with severity of airway diseases. *Hum Exp Toxicol*. 2009;28(12):739-45.
- 39- Attaran D, Lari SM, Towhidi M, Marallu HG, Ayatollahi H, Khajehdaluae M, et al. Interleukin-6 and airflow limitation in chemical warfare patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2010;5:335-40
- 40- Pourfarzam S, Ghazanfari T, Merasizadeh J, Ghanei M, Azimi G, Araghizadeh H, et al. Long-term pulmonary complications in sulfur mustard victims of Sardasht, Iran. *Toxin Rev*. 2009;28(1):8-13.
- 41- Ghanei M, Amiri S, Akbari H, Kosari F, Khalili AR, Alaeddini F, et al. Correlation of sulfur mustard exposure and tobacco use with expression (immunoreactivity) of
- 7- Robert JJ, Warwick GP. Studies of mode of action of alkylation against. VI. The metabolism of BIS-2-chloroethylsulphid (mustard gas) and related compounds. *Biochem Pharmacol*. 1963;12:1329-34.
- 8- Malaviya R, Sunil VR, Cervelli J, Anderson DR, Holmes WW, Conti ML, et al. Inflammatory effects of inhaled sulfur mustard in rat lung. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010;248(2):89-99.
- 9- Ghanei M, Harandi AA. Molecular and cellular mechanism of lung injuries due to exposure to sulfur mustard: A review. *Inhal Toxicol*. 2011;23(7):363-71.
- 10- Emad A, Rezaian GhR. The diversity of the effects of sulfur mustard gas inhalation on respiratory system 10 years after a single, heavy exposure analysis of 197 cases. *CHEST J*. 1997;112(3):734-8.
- 11- Myers JL, Colby TV. Pathologic manifestations of bronchiolitis, constrictive bronchiolitis, cryptogenic organizing pneumonia, and diffuse panbronchiolitis. *Clin Chest Med*. 1993;14(4):611-22.
- 12- Taghaddosinejad F, Fayyaz AF, Behnoush B. Pulmonary complications of mustard gas exposure: a study on cadavers. *Acta Med Iran*. 2011;49(4):233-6.
- 13- Mishra NC, Rir-sima-ah J, Grotendorst GR, Langley RJ, Singh SP, Gundavarapu S, et al. Inhalation of sulfur mustard causes long-term T cell-dependent inflammation: possible role of Th17 cells in chronic lung pathology. *Int Immunopharmacol*. 2012;13(1):101-8.
- 14- Weinberger B, Laskin JD, Sunil VR, Sinko PJ, Heck DE, Laskin DL. Sulfur mustard-induced pulmonary injury: therapeutic approaches to mitigating toxicity. *Pulm Pharmacol Ther*. 2011;24(1):92-9.
- 15- Comerford I, McColl SR. Mini-review series: Focus on chemokines. *Immunol Cell Biol*. 2011 Feb;89(2):183-4.
- 16- Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:659-702.
- 17- Balestrieri ML, Balestrieri A, Mancini FP, Napoli C. Understanding the immunoangiostatic CXC chemokine network. *Cardiovasc Res*. 2008;78(2):250-6.
- 18- Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, et al. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol*. 2000;68(1):1-8.
- 19- Cyster JG. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science*. 1999;286(5447):2098-102.
- 20- Strieter RM, Gomperts BN, Keane MP. The role of CXC chemokines in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*. 2007;117(3):549-56.
- 21- Holloway RA, Donnelly LE. Immunopathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med*. 2013;19(2):95-102.
- 22- MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2005;2(4):258-66.
- 23- Chen H, Wang D, Wang X. Role of airway epithelium-origin chemokines and their receptors in COPD. *J Epithel Biol Pharmacol*. 2010;3:26-33.
- 24- Jin T, Xu X, Hereld D. Chemotaxis, chemokine receptors and human disease. *Cytokine*. 2008;44(1):1-8.
- 25- Keane MP. The role of chemokines and cytokines in lung fibrosis. *Eur Resir Rev*. 2008;17(109):151-6.
- 26- Dong S, Zhang X, He Y, Xu F, Li D, Xu W, et al. Synergy of IL-27 and TNF- $\alpha$  in regulating CXCL10 expression in lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013;48(4):518-30.

- 45- Costa C, Rufino R, Traves SL, Lapa E Silva JR, Barnes PJ, Donnelly LE. CXCR3 and CCR5 chemokines in induced sputum from patients with COPD. *Chest*. 2008;133(1):26-33.
- 46- Saetta M, Di Stefano A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Mapp CE, et al. CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(3 Pt 1):822-6.
- 47- Saetta M, Mariani M, Panina-Bordignon P, Turato G, Buonsanti C, Baraldo S, et al. Increased expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand CXCL10 in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165(10):1404-9.
- p53 protein in bronchial epithelium of Iranian "mustard lung" patients. *Mil Med*. 2007;172(1):70-4.
- 42- Medoff BD, Wain JC, Seung E, Jakobek R, Means TK, Ginns LC, et al. CXCR3 and its ligands in a murine model of obliterative bronchiolitis: regulation and function. *J Immunol*. 2006;176(11):7087-95.
- 43- Beytut E. Anthracosis in the lungs and associated lymph nodes in sheep and its potential role in the occurrence of pneumonia. *Small Ruminant Res*. 2002;46(1),15-21.
- 44- Wang Z, Chen YW, Zhang JN, Hu XF, Peng MJ. Pentoxifylline attenuates cigarette smoke-induced overexpression of CXCR3 and IP-10 in mice. *Chin Med J*. 2012;125(11):1980-5.