©2014 DAZCo, *Danesh Afarand Zistagen Co., IRAN*
ISSN: 2008-2630 *Quarterly of Iranian Journal of War & Public Health 2014;6(4):171-176*

# Evaluation of TLR4 Gene Expression in Mustard Gas Injured Persons' Lungs

**ARTICLE INFO**

***Article Type***
Original Research

***Authors***
Ghaffarpour S.[1] *MSc,*
Ghazanfari T.* *PhD,*
Salehi I.[2] *PhD,*
Askary N.[3] *PhD,*
Mir Afshariyeh A.[4] *PhD,*
Faghihzadeh E.[1] *MSc*

**How to cite this article**
Ghaffarpour S, Ghazanfari T, Salehi I, Askary N, Mir Afshariyeh A, Faghihzadeh E. Evaluation of TLR4 Gene Expression in Mustard Gas Injured Persons' Lungs. Iranian Journal of War & Public Health. 2014;6(4):171-176.

**ABSTRACT**

**Aims** Recurrent respiratory infections are one of the clinical protests of those with delayed complications of exposure to mustard gas. Studies Show that inflammatory mediators have been changed in serum, sputum and Broncho-Alveolar Lavage (BAL) samples of chemical victims. Regarding TLR4 importance in inflammation and response to infections, this study aimed to investigate TLR4 gene expression in chemical victims' lung tissues.

**Materials & Methods** In this case-control study, paraffin blocks of lung tissue samples were collected from 28 veterans exposed to mustard gas with delayed pulmonary complications (cases group) and 9 pulmonary samples from the subjects with no mustard exposure (controls group) from the archive of some hospitals during 2013-2014. Slides samples from lung paraffin blocks stained with Hematoxylin and Eosin (H&E) were prepared. Real-time PCR was used to evaluate RNA expression. ΔΔCT median was used to measure the relative genes expression. Comparison of data was done using Mann-Whitney test by SPSS 21 software.

**Findings** In case group, 12 patients (42.8%) were diagnosed with constructive bronchiolitis, 8 patients (28.6%) with respiratory bronchiolitis and 8 patients (28.6%) with other disease and in control group, 4 patients (44.4%) with constructive bronchiolitis, 1 patient (11.2%) with respiratory bronchiolitis and 4 patients (44.4%) were diagnosed with other diseases. Case group ΔΔCT median was 5.28±3.58cyc and that of control group was 5.81±3.29cyc that gad no significant difference ($p>0.05$).

**Conclusion** As there is pathological similarity in lung tissues of both groups, it seems that TLR4 gene expression undergoes same changes.

**Keywords** Mustard Gas; Bronchiolitis; Lung; Toll-Like Receptor 4; Polymerase Chain Reaction

*Immunoregulation Research Center, Shahed University, Tehran, Iran
[1]Immunoregulation Research Center, Shahed University, Tehran, Iran
[2]Immunology Department, Medicine Faculty, Tehran University, Tehran, Iran
[3]Biology Department, Sciences Faculty, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
[4]Pathology Department, Medicine Faculty, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

***Correspondence***
*Address*: Immunoregulation Research Center, 4th floor, Research Center Building of Shahed University, No. 1471, Corner of Mehr Alley, North Karegar Street, Tehran, Iran
*Phone*: +98 2166418216
*Fax*: +98 2166419752
tghazanfari@yahoo.com

***Article History***
Received: July 9, 2014
Accepted: August 25, 2014
ePublished: September 20, 2014

**CITATION LINKS**

[1] COPD Due to Sulfur ... [2] Use of immunohistochemistry techniques in patients exposed to sulphur mustard ... [3] Molecular and cellular mechanism of lung injuries due to exposure to sulfur mustard: A ... [4] Long-term effects of mustard gas on respiratory system of Iranian veterans after Iraq-Iran war: A ... [5] The chronic effects of sulfur mustard ... [6] Alterations in the serum levels of chemokines 20 years after sulfur mustard exposure: Sardasht-Iran Cohort ... [7] Serum levels of IL-8 and IL-6 in the long term pulmonary complications induced by sulfur mustard: Sardasht-Iran ... [8] Chemokines, MMP-9 and PMN elastase in spontaneous sputum of sulfur mustard exposed civilians ... [9] Alterations in serum levels of inflammatory cytokines ... [10] Alterations in the serum levels of soluble L, P and E-selectin 20 years after ... [11] Serum profiles of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in ... [12] Fibrinogen and inflammatory cytokines in spontaneous sputum of ... [13] Clinical Review of Mustard ... [14] Evaluation of microbial resistance to antibiotics in ... [15] Levels of cytokine in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid in ... [16] Intrinsic and extrinsic regulation of ... [17] Toll-like ... [18] Impact of air pollution on lung inflammation and ... [19] Differential gene expression profiling of mouse skin after sulfur mustard exposure: Extended time response and ... [20] Correlation between MMP9 and MMP9/ TIMPs complex ... [21] Dual role of Toll-like receptors in ... [22] Expression of toll-like receptor 2 and 4 is increased in ... [23] Bronchiolitis obliterans in ... [24] Analysis of relative gene expression data ... [25] Toll-like receptors and ... [26] An international collaborative pathologic study ... [27] Alloimmune lung injury induced by ... [28] The Role of Hyaluronan Degradation ... [29] Beta defensin-2 is reduced in central ... [30] Beta defensin-2 is reduced in central production from ...

# ارزیابی بیان ژن TLR4 در ریه مصدومان شیمیایی مواجه با گاز خردل

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۵/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۶/۰۳
*نویسنده مسئول: tghazanfari@yahoo.com

**سارا غفارپور MSc**
مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
**طوبی غضنفری* PhD**
مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
**عیسی صالحی PhD**
گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
**نیره عسکری PhD**
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
**عباس میرافشاریه PhD**
گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
**الهام فقیه‌زاده MSc**
مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

## چکیده

**اهداف:** عفونت‌های تنفسی راجعه از تظاهرات بالینی افراد مبتلا به عوارض دیررس مواجهه با گاز خردل است. مطالعات نشان می‌دهند که میانجی‌های التهابی در نمونه‌های سرم، خلط و لاواژ برونشی- آلوئولی مصدومان شیمیایی تغییر می‌یابد. با توجه به اهمیت TLR4 در التهاب و پاسخ به عفونت‌ها، این مطالعه با هدف بررسی میزان بیان ژن TLR4 در بافت ریه مصدومان شیمیایی انجام پذیرفت.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه مورد- شاهدی، نمونه‌های بلوک پارافینه ریه ۲۸ جانباز شیمیایی مواجه با گاز خردل با عوارض ریوی دیررس (گروه مورد) و ۹ نمونه ریه افراد بدون مواجهه با گاز خردل (گروه شاهد) از آرشیو چند بیمارستان در سال‌های ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ اخذ شد. نمونه‌های لام تهیه‌شده از بلوک پارافینه ریه با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین آماده شدند. به‌منظور بررسی بیان RNA از روش ریل‌تایم PCR استفاده شد. برای سنجش نسبی بیان ژن‌ها از روش موسوم به ΔΔCT استفاده شد. مقایسه بین داده‌ها با آزمون من- ویتنی با استفاده از نرم‌افزار SPSS 21 انجام شد.

**یافته‌ها:** در گروه مورد، ۱۲ بیمار (۴۲/۸٪) مبتلا به برونشیولیت انسدادی، ۸ بیمار (۲۸/۶٪) مبتلا به برونشیولیت تنفسی و ۸ بیمار (۲۸/۶٪) مبتلا به بیماری دیگر و در مورد گروه شاهد، ۴ بیمار (۴۴/۴٪) مبتلا به برونشیولیت انسدادی، ۱ بیمار (۱۱/۲٪) مبتلا به برونشیولیت تنفسی و ۴ بیمار (۴۴/۴٪) مبتلا به بیماری دیگر تشخیص داده شدند. میانه ΔΔCT گروه مورد ۳/۵۸±۵/۲۸سیکل و گروه شاهد ۳/۲۹±۵/۸۱سیکل بود که اختلاف معنی‌داری نداشت ($p>0/05$).

**نتیجه‌گیری:** با توجه به شباهت دو گروه از لحاظ پاتولوژیک، به‌نظر می‌رسد که تغییرات مشابهی در بیان این ژن رخ داده است.

**کلیدواژه‌ها:** گاز خردل، برونشیولیت انسدادی، بافت ریه، گیرنده شبهToll ۴، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

## مقدمه

عوارض حاد (کوتاه‌مدت) و دیررس (بلندمدت) می‌تواند پیامد مواجهه با گاز خردل باشد. به‌طور کلی، اثرات دیررس گاز خردل چندین سال پس از مواجهه ایجاد می‌شود و متفاوت از عوارض "تماس‌های بلندمدت مداوم" (مثلاً مواجهه دایم با آلاینده‌ها در محیط کار) است. مطالعات مختلف شایع‌ترین عوارض دیررس را اختلالات ریوی معرفی می‌کنند [۱]. از جمله این اختلالات می‌توان به بیماری ریوی انسدادی مزمن (COPD)، برونشیت مزمن (CB)، برونشیولیتیس آبلیترانس (BO)، برونشکتازی و ازدیاد پاسخ ریوی اشاره کرد [۱]. مطالعات اندکی به‌منظور آسیب‌شناسی ریه مصدومان شیمیایی انجام شده اما براساس همین مطالعات محدود به‌نظر می‌رسد که برونشیت انسدادی پیامد اصلی مواجهه با گاز خردل باشد [۲]. در برخی موارد، بیماری‌های ایجادشده در مصدومان شیمیایی با همان بیماری که در اثر عوامل دیگر ایجاد شده (بیماری BO در پی پیوند ریه و بیماری COPD در اثر مصرف سیگار) متفاوت است. به علت ویژگی‌های خاص، اختلالات تنفسی در مصدومان شیمیایی با عنوان "ریه خردلی" شناخته می‌شوند [۵-۳].

مکانیسم اصلی عوارض ریوی دیررس ناشی از تماس با گاز خردل هنوز شناخته نشده است. گرچه پاتوژنز بیماری COPD تا حدود زیادی مشخص شده و غالباً بر اثر التهاب مزمن و استرس اکسایشی به دنبال فعال‌شدن سلول‌های التهابی مسیر هوایی رخ می‌دهد، اما مطالعات اندکی در مورد التهاب ریه خردلی وجود دارد [۱]. نتایج مطالعه متعدد نشان می‌دهند که در میزان فاکتورهای اساسی دخیل در التهاب اعم از سایتوکاین‌ها، کموکاین‌ها، مولکول‌های چسبان و ماتریکس متالوپروتئازها در نمونه‌های سرمی و خلط مصدومان شیمیایی، ۲۰ سال پس از مواجهه با گاز خردل، تغییراتی به وقوع می‌پیوندد [۱۲-۶]. علیرغم این یافته‌ها، تاکنون گزارشی در مورد ارزیابی موضعی این مولکول‌ها و سایر مولکول‌های دخیل در التهاب، به‌عنوان نمای مصوری از تغییرات ایمونولوژیک ریه خردلی، ارایه نشده است.

با توجه به اینکه عفونت‌های تنفسی راجعه از تظاهرات بالینی افراد مبتلا به عوارض دیررس مواجهه با گاز خردل است [۱۳] و پناهی و همکاران [۱۴] نیز تنوعی از باکتری‌ها (که غالباً از جمله فلور دستگاه تنفسی بودند) را در این بیماران گزارش کرده‌اند؛ همچنین، *عماد* و *عماد* [۱۵] اختلاف معنی‌دار سطح سایتوکاین‌های التهابی نظیر IL-8، IL-1β، IL-6، TNFα و IL-12 را در سطح لاواژ

برونشی آلوئولی (BAL) بین بیماران برونشکتازی مواجه با گاز خردل و افراد سالم گزارش کرده‌اند، به‌نظر می‌رسد که گیرنده شبهToll (TLR) نقش مهمی در پاتوژنز اختلالات ریوی ناشی از گاز خردل ایفا می‌کند. TLR-4، به‌عنوان گیرنده بسیار مهمی از این گروه، بر طیف وسیعی از سلول‌های موجود در بافت یا فراخوانده‌شده به موضع همچون سلول‌های اپیتلیال، ماکروفاژ آلوئولار، نوتروفیل، مونوسیت، دندریتی و T بیان می‌شود که با اتصال به لیگاندهای برون‌زا (لیپوپلی‌ساکارید موجود در غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی) و درون‌زا (همچون گونه‌های فعال اکسیژن) فعال شده و پیام‌رسانی ناشی از آن، میانجی‌های التهابی نظیر سایتوکایین‌ها، کموکایین‌ها، مولکول‌های چسبان، ماتریکس متالوپروتئازها و غیره تولید می‌شوند [۱۸-۱۶] که به تغییر آنها در نمونه‌های سرم، خلط و BAL جانبازان اشاره شده است.

در مطالعه گرک و همکاران در نمونه پوست موش‌هایی که یک دوره با گاز خردل مواجه شده بودند، تغییر بیان دسته‌ای از ژن‌ها پس از ۲۴، ۷۲ و ۱۶۸ بررسی و افزایش بیان TLR4 پس از ۷۲ و ۱۶۸ساعت (به‌عنوان فاز دیررس) گزارش شده است [۱۹]. همچنین براساس نتایج مطالعات مصدومان شیمیایی سردشت، MMP-9، به‌عنوان محصول فعال‌شدن TLR4، در نمونه‌های سرم بیماران مواجه با گاز خردل مبتلا به عوارض ریوی شدید نسبت به سرم افراد نامواجه با گاز خردل افزایش می‌یابد و با درصد FVC (نشانگر عملکرد ریه) رابط معکوسی نشان می‌دهد [۸، ۲۰].

از آنجایی که ارزیابی TLR4 در نمونه ریه جانبازان شیمیایی تاکنون صورت نگرفته و با توجه به اهمیت نقش این مولکول در ایجاد فرآیندهای پیام‌رسانی التهابی و همچنین با توجه به گزارش‌های متعدد در مورد تغییر بیان این نشانگر در بیماری‌های التهابی مزمن ریوی (همچون COPD، BO و IPF) [۲۳-۲۱]، این مطالعه با هدف بررسی میزان بیان ژن TLR4 در بافت ریه مصدومان شیمیایی دارای عوارض ریوی دیررس ناشی از گاز خردل انجام شد.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه مورد- شاهدی، نمونه‌های بلوک پارافینه ریه ۲۸ جانباز شیمیایی مواجه با گاز خردل با عوارض ریوی دیررس (گروه مورد) و ۹ نمونه ریه افراد بدون مواجهه با گاز خردل (گروه شاهد) از آرشیو چند بیمارستان در سال‌های ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ اخذ شد. بلوک‌های مورد استفاده طی ۵ تا ۱۰ سال منتهی به زمان مطالعه به‌منظور تشخیص بیماری تهیه شده بود. معیارهای ورود به مطالعه جنسیت مذکر، سن بین ۳۰ تا ۶۰ سال، سابقه مواجهه با گاز خردل در جنگ ایران و عراق طبق پرونده‌های تاییدشده در کمیسیون پزشکی بنیاد شهید و امور ایثارگران و تشخیص عوارض دیررس ریوی شایع نظیر سرفه، دفع اخلاط و تنگی نفس به علت ناراحتی ریوی در پرونده پزشکی بود.

نمونه‌های لام تهیه‌شده از بلوک پارافینه ریه با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) آماده شدند [۱۸] و پس از تشخیص آسیب‌شناختی توسط پاتولوژیست ریه در دو گروه برونشیولیت انسدادی و برونشیولیت تنفسی قرار گرفتند. به‌منظور بررسی بیان RNA از روش ریل‌تایم PCR (real-time PCR) استفاده شد. برای این کار دو برش ۱۸میکرونی از هر نمونه تهیه و RNA با استفاده از کیت RNeasy FFPE (Qiagen؛ آلمان) و منطبق با دستورالعمل آن (به استثنای تیمار ۱۶ساعته با آنزیم پروتئیناز) استخراج شد. سپس نمونه‌ها با آنزیم Dnase (Fermantase؛ ایالات متحده) به‌مدت ۴۵دقیقه در ۳۷°C تیمار شدند و فعالیت آنزیم از طریق انکوباسیون با EDTA به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۶۵°C متوقف گردید. غلظت و میزان جذب نمونه‌ها با اسپکتروفوتومتر 2000c UV-Vis نانودراپ (Thermo Scientific؛ ایالات متحده) اندازه‌گیری شد. ۱میکروگرم از هر نمونه RNA با کیت PrimeScript RT reagent (Takara Bio Inc؛ ژاپن) به cDNA تبدیل شد. سپس میزان بیان TLR4 و GAPDH (به‌عنوان ژن مرجع) از طریق پرایمرهایی که اختصاصی‌بودن آنها در BLAST مورد تایید قرار گرفته (جدول ۱) با استفاده از مستر میکس SYBR® Premix Ex Taq II (Takara Bio Inc؛ ژاپن) با دستگاه StepOneplus (ABI System؛ ایالات متحده) ارزیابی شد.

**جدول ۱)** پرایمرهای مورد استفاده در ریل‌تایم PCR (GAPDH به‌عنوان ژن مرجع برای نرمالیزه‌کردن نتایج مورد استفاده قرار گرفت)

| ژن هدف | پرایمر | دمای آنیلینگ | طول آمپلیکون |
|---|---|---|---|
| TLR4 | F: AGAATGCTAAGGTTGCCGCT<br>R: CTATCACCGTCTGACCGAGC | ۶۵°C | ۱۳۶bp |
| GAPDH | F: TTGCCCTCAACGACCACTTT<br>R: TGGTCCAGGGGTCTTACTCC | ۶۰°C | ۱۲۰bp |

برای سنجش نسبی بیان ژن‌ها از روش موسوم به ΔΔCT استفاده شد [۲۴]. بازده دو ژن از طریق رقیق‌سازی نمونه cDNA به نسبت ۱:۵ انجام و اختلاف بین آنها به کمتر از ۵٪ رسید.

مقایسه بین داده‌ها با آزمون من- ویتنی با استفاده از نرم‌افزار SPSS 21 انجام شد.

## یافته‌ها

میانگین سنی گروه مورد ۱۱/۱۳±۴۱/۹۵سال و گروه شاهد ۱۱/۶۴±۴۹/۷۲سال در زمان نمونه‌گیری بود (p>۰/۰۵). در گروه مورد، ۱۲ بیمار (۴۲/۸٪) مبتلا به برونشیولیت انسدادی، ۸ بیمار

(۲۸/۶٪) مبتلا به برونشیولیت تنفسی و ۸ بیمار (۲۸/۶٪) مبتلا به بیماری دیگر و در مورد گروه شاهد، ۴ بیمار (۴۴/۴٪) مبتلا به برونشیولیت انسدادی، ۱ بیمار (۱۱/۲٪) مبتلا به برونشیولیت تنفسی و ۴ بیمار (۴۴/۴٪) مبتلا به بیماری دیگر تشخیص داده شدند.

نسبت جذب $A_{260}$ به $A_{280}$ نمونه‌ها ۱/۸۶±۰/۱۲ بود. میانه $\Delta\Delta CT$ گروه مورد ۵/۲۸±۳/۵۸سیکل و گروه شاهد ۵/۸۱±۳/۲۹سیکل بود که اختلاف معنی‌داری نداشت (p=۰/۸۷۶). با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$، کاهش بیان TLR4 در گروه مورد به نسبت ۰/۴۹ : ۱ نسبت به گروه کنترل مشاهده شد که این تفاوت معنی‌دار نبود (p=۰/۸۷۶).

## بحث

گیرنده‌های TLR در القای پاسخ‌های ایمنی علیه تعداد زیادی از پاتوژن‌ها نقش اساسی ایفا می‌کنند. همچنین، شواهدی منوط بر فعال‌شدن آنها از طریق مولکول‌های ضدمیکروبی (نظیر گونه‌های فعال اکسیژن) و محصولات ناشی از آسیب و مرگ سلولی وجود دارد. احتمالاً این گیرنده‌ها نقش مهمی در آسیب‌شناسی طیفی از بیماری‌های التهابی ریوی از "سندرم دیسترس ریوی حاد" (ARDS) که از عوارض زودرس ریوی مصدومان شیمیایی است تا بیماری‌های مزمن ریوی چون COPD و BO ایفا می‌کنند و هدف قراردادن پیام‌رسانی آنها، فرصت‌های درمانی مهمی برای اختلالات ریوی فراهم می‌کند [۲۵]. هدف از این مطالعه، بررسی میزان بیان ژن TLR4 در بافت ریه مصدومان شیمیایی دارای عوارض ریوی دیررس ناشی از گاز خردل بود تا با روشن‌شدن وضعیت ایمونوپاتولوژیک بیماری گام‌های بهینه‌ای به‌منظور درمان این بیماران برداشته شود.

همسو با نتایج مطالعات دیگر که اصلی‌ترین عارضه دیررس ریوی بیماران مواجه با گاز خردل را برونشیولیت انسدادی گزارش کرده‌اند [۲]، در مطالعه حاضر نیز عارضه ۴۲/۵۸٪ بیماران گروه مورد و ۴۴/۴٪ بیماران گروه شاهد برونشیولیت انسدادی تشخیص داده شد. همچنین اختلاف معنی‌داری بین سطح mRNAی TLR4 دو گروه مشاهده نشد که حاکی از تغییر مشابه این مولکول در بین دو گروه است ولی با توجه به اندک‌بودن نمونه‌های مصدومان شیمیایی به‌علت دشواری دسترسی و همچنین عدم دستیابی به نمونه‌های شاهد سالم، نیاز به بررسی بیشتر برای حصول نتیجه قطعی وجود دارد. در پژوهش گِرِک و همکاران، پس از یک بار مواجهه پوست موش با گاز خردل، افزایش بیان TLR4 پس از ۷۲ و ۱۶۸ساعت (فاز دیررس) گزارش شده است که این زمان برای بررسی فاز دیررس بیماری زمان کمی است. علاوه بر این، بافت مواجه با گاز خردل نیز متفاوت از مطالعه ما بوده است [۱۹].

براساس نتایج مطالعات، بیشترین عارضه تاخیری ریوی COPD و BO است که در این دو بیماری التهابی ریوی، تغییر بیان TLR4 مشاهده شده است [۳، ۲۶]. برونشیولیت انسدادی بیماری نسبتاً نادری است که به‌طور معمول در بیمارانی با سابقه عفونت در دوران کودکی، تنفس بخار سمّی (همچون دی‌استیل و گاز خردل)، ابتلا به "میزبان در مقابل پیوند" (Graft-versus-host) و رد پیوند مزمن به دنبال پیوند مغز استخوان، ریه یا قلب- ریه رخ می‌دهد و از لحاظ آسیب‌شناختی، با الگوی متمایز التهاب مزمن اطراف برونشیال، تراوش و فیبروز اطراف لومن که منجر به انسداد مسیر هوایی، باقی‌ماندن جای زخم در لومن برونشیال و ازدست‌رفتن مسیر هوایی می‌گردد، شناخته می‌شود. BO که به دنبال پیوند ریه ایجاد می‌شود، در این گروه قرار دارد [۲]. در بیماران BO، آسیب ایسکمی/پرفیوژن مجدد قابل‌توجه حین پیوند محتمل است و خطر عفونت ممکن است فرد دریافت‌کننده بافت را نسبت به فعال‌شدن گیرنده‌های TLR از طریق لیگاندهای درون‌زا و برون‌زا پس از پیوند آسیب‌پذیر کند. در مطالعه‌ای حیوانی نشان داده شد که LPS، لیگاند TLR4، فنوتیپ BO را در مدل موشی پیوند مغز استخوان آلوژنیک تقویت می‌کند که نقش ایمنی ذاتی در فیبروز وابسته به آلوایمن را پیشنهاد می‌کند [۲۷]. همچنین نقص TLR4 در مدل موشی ایسکمی/پرفیوژن مجدد، تولید سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها و آسیب عروقی را به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌دهد [۲۳]. علاوه بر این، قطعات هیالورونان که لیگاند درون‌زای TLR4 محسوب می‌شوند، با سندرم BO در دریافت‌کنندگان پیوند ریه در ارتباط است [۲۸].

در مطالعه پِپِس و همکاران میزان بیان TLR4 و بتادفنسین در نمونه ریه بیماران سیگاری مبتلا به COPD، ارزیابی شده است. در این مطالعه افزایش TLR4 در مسیرهای هوایی دور و مرکزی بیماران سیگاری و افرادی که آن را ترک کردند و همچنین افراد کنترلی که سیگار مصرف می‌کردند، نسبت به افراد کنترل سالم بدون سابقه مصرف سیگار به روش ایمونوهیستوشیمی گزارش شده است. همچنین، افزایش بیان بتادفنسین که پس از تحریک TLR4 تولید می‌شود نیز در مسیر هوایی دور نشان داده شده است. لازم به ذکر است که نمونه‌های مورد استفاده از افراد مبتلا به سرطان ریه گرفته شده است [۲۹]. همچنین، در مطالعه دیگری، افزایش بیان TLR4 و TLR9 در سلول‌های CD8+ T در نمونه ریه بیماران COPD به نسبت افراد سالم گزارش شده است. البته باید در نظر داشت که در این مطالعه بیان TLR4 در کل بافت تغییر معناداری نداشته است [۳۰].

در تمامی مطالعات ذکرشده، افزایش بیان TLR4 در نمونه حیوانات مواجه با گاز خردل و بیمارانی با عارضه مشابه ریه خردلی، می‌تواند دلیلی بر نقش احتمالی این گیرنده در پاتوژنز عوارض تاخیری ریوی باشد. شاید این نقش در ریه افراد مواجه با گاز خردل مشابه آن چیزی است که در افراد غیرمواجه با پاتولوژی مشترک دیده می‌شود. در تمام مطالعات نمونه‌های بیمار با شاهدهای سالم مقایسه

شده‌اند، درصورتی‌که در مطالعه حاضر به‌علت عدم دسترسی به نمونه‌های سالم امکان مقایسه بهتر و نمایش تغییر بیان TLR4 وجود نداشت و پیشنهاد می‌شود این مطالعه با تعداد نمونه بیشتر و همچنین با بررسی مقایسه‌ای با نمونه‌های سالم ادامه یابد.

استخراج RNA از بافت پارافینه با محدودیت‌هایی چون خردشدن RNA به‌علت واکنش با فرمالین، همراه است. از این رو احتمال وجود پراکنش میان داده‌ها زیاد است. ولی با توجه به عدم دسترسی به بافت تازه، راهی به غیر از استفاده از نمونه‌های پارافینه وجود ندارد. به همین علت برای کاهش پراکنش داده‌ها نیاز به نمونه‌های بیشتری وجود دارد. علاوه بر این، غالب نمونه‌گیری‌های برای انجام آزمون‌های پاتولوژیک به‌صورت سوزنی هستند و در نتیجه دسترسی به نمونه‌های بیشتر و سالم را با مشکلاتی مواجه می‌کنند. با توجه به عدم تفاوت قابل توجه بین دو گروه مورد مطالعه، به‌نظر می‌رسد که ارزیابی بیشتر این مولکول در سطح سلول‌های ریوی با مشخص‌کردن نوع سلول‌ها از طریق تکنیک‌های ایمونوهیستوشیمی و ایمونوفلورسانت، شناخت بهتری در مورد اهمیت TLR4 در پاتوژنز بیماری به همراه خواهد داشت.

## نتیجه‌گیری

بیان ژن TLR4 در بافت ریه مصدومان شیمیایی و سایر بیماران ریوی با آسیب‌شناسی برونشیولیت انسدادی مشابهت دارد.

**تشکر و قدردانی:** موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

**تاییدیه اخلاقی:** موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

**تعارض منافع:** موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

**منابع مالی:** موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

## منابع

1- Lari SM, Attaran D, Towhidi M. COPD Due to Sulfur Mustard (Mustard Lung). In: Ong KCh, editor. Chronic Obstructive Pulmonary Disease - Current Concepts and Practice. Croatia: InTech; 2012. pp. 231-8.

2- Ghanei M, Chilosi M, Hosseini Akbari HM, Motiei-Langroudi R, Amini Harandi A, Shamsaei H, et al. Use of immunohistochemistry techniques in patients exposed to sulphur mustard gas. Pathol Res Int. 2011. Available From: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3138111.

3- 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.

4- 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. Chinese J Traumatol. 2013;16(3):163-8.

5- Rowell M, Kehe K, Balszuweit F, Thiermann H. The chronic effects of sulfur mustard exposure. Toxicology. 2009;263(1):9-11.

6- 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.

7- Pourfarzam S, Ghazanfari T, Yaraee R, Ghasemi H, Hassan ZM, Faghihzadeh S, et al. Serum levels of IL-8 and IL-6 in the long term pulmonary complications induced by sulfur mustard: Sardasht-Iran Cohort Study. Int Immunopharmacol. 2009;9(13-14):1482-8.

8- Pourfarzam S, Yaraee R, Hassan ZM, Yarmohammadi ME, Faghihzadeh S, Soroush MR, et al. Chemokines, MMP-9 and PMN elastase in spontaneous sputum of sulfur mustard exposed civilians: Sardasht-Iran Cohort Study. Int Immunopharmacol. 2013;17(3):958-63.

9- 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.

10- 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.

11- Kiani A, Mostafaie A, Shirazi FH, Ghazanfari T. Serum profiles of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in long-term pulmonary complication induced by sulfur mustard: Sardasht-Iran Cohort Study (SICS). Int Immunopharmacol. 2013;17(3):964-7.

12- Yaraee R, Hassan ZM, Pourfarzam S, Rezaei A, Faghihzadeh S, Ebtekar M, et al. Fibrinogen and inflammatory cytokines in spontaneous sputum of sulfur-mustard-exposed civilians--Sardasht-Iran Cohort Study. Int Immunopharmacol. 2013;17(3):968-73.

13- Ghanei M, Adibi I. Clinical Review of Mustard Lung. IJMS. 2007;32(2):58-65.

14- Panahi Y, Ghanei M, Aslani J, Mojtahedzadeh M, Sarhangnejad R, Barkhordari A. Evaluation of microbial resistance to antibiotics in patients with chronic pulmonary lesions due to chemical agents and non-chemical agents. J Mil Med. 2004;6(3):181-6. [Persian]

15- Emad A, Emad Y. Levels of cytokine in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid in patients with pulmonary fibrosis due to sulfur mustard gas inhalation. J Interferon Cytokine Res. 2007;27(1):38-43.

16- Joeong E, Lee J. Intrinsic and extrinsic regulation of innate immune receptors. Yonsei Med J. 2011;52(3):379-92.

17- Takeda K, Kaisho T, Akira Sh. Toll-like receptors. Ann Rev Immunol. 2003;21:335-76.

18- Plummer LE, Smiley-Jewell S, Pinkerton KE. Impact of air pollution on lung inflammation and the role of Toll-like receptors. Int J Interferon Cytokine Mediator Res. 2012;4:43-57.

19- Gerecke DR, Chen M, Isukapalli SS, Gordon MK, Chang YC, Tong W, et al. Differential gene expression profiling of mouse skin after sulfur mustard exposure: Extended time response and inhibitor effect. Toxicol Appl Pharmacol. 2009;234(2):156-65.

20- Ghaffarpour S, Ghazanfari T. Correlation between MMP9 and MMP9/ TIMPs complex with pulmonary function in sulfur mustard exposed civilians: Sardasht-Iran Cohort Study. Iran J Immunol. 2014;11:458-9.

21- Bezemer GF, Sagar S, van Bergenhenegouwen J, Georgiou NA, Garssen J, Kraneveld AD, et al. Dual role of Toll-like receptors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Pharmacol Rev. 2012;64(2):337-58.

22- Go H, Koh J, Kim HS, Jeon YK, Chung DH. Expression of toll-like receptor 2 and 4 is increased in the respiratory

epithelial cells of chronic idiopathic interstitial pneumonia patients. Respir Med. 2014;108(5):783-92.
23- Grossman EJ, Shilling RA. Bronchiolitis obliterans in lung transplantation: The good, the bad, and the future. Transl Res. 2009;153(4):153-65.
24- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001;25(4):402-8.
25- Chaudhuri N, Dower SK, Whyte MK, Sabroe I. Toll-like receptors and chronic lung disease. Clin Sci. 2005;109(2):125-33.
26- Ghanei M, Tazelaar HD, Chilosi M, Harandi AA, Peyman M, Akbari HM, Shamsaei H, et al. An international collaborative pathologic study of surgical lung biopsies from mustard gas-exposed patients. Respir Med. 2008;102(6):825-30
27- Garantziotis S, Palmer S, Snyder L, Ganous T, Chen B, Wang T, et al. Alloimmune lung injury induced by local innate immune activation through inhaled lipopolysaccharide. Transplantation. 2007;84(8):1012-9.
28- Tesar BM, Jiang D, Liang J, Palmer SM, Noble PW, Goldstein DR. The Role of Hyaluronan Degradation Products as Innate Alloimmune Agonists. Am J Transplant. 2006;6(11):2622-35.
29- Pace E, Ferraro M, Minervini MI, Vitulo P, Pipitone L, Chiappara G, et al. Beta defensin-2 is reduced in central but not in distal airways of smoker COPD patients. PLoS One. 2012;7(3):e3360.
30- Nadigel J, Préfontaine D, Baglole CJ, Maltais F, Bourbeau J, Eidelman DH, et al. Cigarette smoke increases TLR4 and TLR9 expression and induces cytokine production from CD8+ T cells in chronic obstructive pulmonary disease. Respir Res. 2011;12(1):149.