

بررسی بیان ژن مهار کننده بافتی نوع یک (TIMP1) در نمونه های

ریوی مصدومین شیمیائی مواجه شده با گاز خردل

ارزن زرین آ^۱، بهمنش م^{۱*}، قانع م^۲، تولایی م^۲

۱- گروه ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت مدرس، تهران ایران، صندوق پستی: ۱۷۵-۱۴۱۵

۲- مرکز تحقیقات آسیب های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

*نویسنده مسئول مکاتبات، آدرس الکترونیکی: behmanesh@modares.ac.ir

چکیده

اکثر مصدومین شیمیائی جنگ تحمیلی به بیماری ریوی برونشیت مزمن مبتلا هستند. با استفاده از تکنیک ELISA مشخص شده است که مقدار پروتئین فاکتور رشد تغییر دهنده ($TGF-\beta 1$) در مایع برونشیولی آلوئولی (Bronchoalveolar Lavage, BAL) افراد مصدوم افزایش یافته است. $TGF-\beta$ دارای وظایف مختلفی می باشد که القای بیان ژنهای مهار کننده های بافتی ماتریکس متالوپروتئینازها (TIMPs) یکی از اعمال این فاکتور می باشد که به نوبه خود منجر به تجمع ماتریکس خارج سلولی می شود. TIMP1 یکی از اعضای مهم خانواده مهار کننده های بافتی متالوپروتئینازها است که در هموستاز ماتریکس خارج سلولی نقش مهمی بازی می کند. در این طرح نیز به منظور بررسی اثر افزایش $TGF-\beta 1$ بر روی TIMP1، بیان این ژن در نمونه های ریه افراد مصدوم شده با سولفور موسنارد و افراد کنترل مقایسه شد. با روش برونکوسکوپی و استفاده از پنس های مخصوص ۱۴ نمونه ریوی از گروه سالم و ۲۱ نمونه از افراد مصدوم جمع آوری شده و بعد از استخراج RNA، cDNA تک رشته ای ساخته شد. با استفاده از تکنیک semi-quantitative RT-PCR میزان بیان TIMP1 در این نمونه ها بررسی گردید. بیان ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیان ژن TIMP1 به طور معنی داری در گروه مصدومین دچار افزایش می شود. نتایج ما پیشنهاد می کند که TIMP1 در فرایند بازآرایی مجاری هوایی و بهبود بیماری مزمن ریه مصدومین دخیل بوده و افزایش بیان این ژن احتمالا سبب کاهش تجزیه ماتریکس خارج سلولی در سلول های مجاری هوایی مصدومین می شود.

واژه های کلیدی

مصدومین شیمیائی سولفور موسنارد،
مهار کننده ی بافتی متالوپروتئینازها نوع ۱
(TIMP1)،
Semi- quantitative RT-PCR

مقدمه

سولفور موستارد (SM) خالص به صورت مایع شفاف، بی رنگ، تقریباً بدون بو و چربی دوستی است که به راحتی به بافت اپیتلیوم نفوذ می کند (۱). در افراد فاقد پوشش مناسب که در معرض این ترکیب قرار می گیرند اندام های پوست، مجاری هوائی و چشم دارای احتمال آسیب دیدگی بالاتری هستند (۲). آخرین استفاده نظامی از آن در جنگ ایران و عراق (۱۹۸۰-۱۹۸۸) بود که توسط رژیم بعث عراق علیه افراد نظامی و غیر نظامی ایران مورد استفاده قرار گرفت و سبب مصدوم شدن حدود ۱۰۰۰۰۰ نفر گردید. در حال حاضر یک سوم این تعداد از ناراحتی های ثانویه حاصل از این گاز رنج می برند (۳).

در یک مطالعه در ایران، ۳۴۰۰۰ نفر از رزمندگان در قید حیات که سابقه مسمومیت با SM را داشتند از نظر ابتلا به ناراحتی های ثانویه شایع مربوط به این ترکیب، مورد غربالگری قرار گرفتند. ۴۲/۵ درصد از این جمعیت دارای اختلال در تست عملکرد تنفسی، ۳۹/۳ درصد دارای یافته های غیر طبیعی در معاینه چشم و ۲۴/۵ درصد دارای یافته های غیر طبیعی در معاینه پوست بودند. لازم به ذکر است که وجود یکی از این یافته ها در هر یک از بیماران به معنایی فقدان سایر موارد نبوده و در بعضی از بیماران بیش از یک یافته غیر طبیعی وجود داشت (۴).

بیماری مزمن ریه عامل اصلی ناتوانی و مرگ و میر در بین مصدومین شیمیائی می باشد. مطالعات مختلف نشان داده است که برونشیت انسدادی (اوبلیتران) (Constrictive or Obliterative Bronchiolitis) شایع ترین بیماری ریوی در مصدومین شیمیائی ایرانی است (۵، ۶). به دام افتادن هوا در ریه (Air Trapping)، کاهش موزائیکی پارانشیم ریه، نامنظم و گشاد شدن مجاری هوائی بزرگ، ضخیم شدن دیواره برونش ها و تیغه های بین لوبولی از علائمی بود که در این بیماران مشاهده شد که همگی مویید بیماری برونشیت انسدادی می باشند (۷).

مطالعات متعدد نشان داده است که اختلال در مسیرهای پیام رسانی مختلف از جمله مسیرهای مرتبط با گیرنده فاکتور رشد اپی تلیالی (۸) (EGFR, Epithelial growth factor receptor)،

مسیرهای پیام رسانی فاکتور تغییر دهنده ی رشد (۹-۱۱) (TGF- β , Transforming growth factor- β)، مسیر پیام رسانی فاکتور آلفای نکروز کننده توموری (۱۲) (TNF- α , Tumor Necrosis Factor- α) و مسیر پیام رسانی فاکتور رشد اپیتلیال عروقی (۱۳)، (۱۴) (VEGF, Vascular epithelial growth factor) دارای نقش مهمی در ایجاد بیماری های مختلف ریوی می باشند.

در مطالعه ای که با استفاده از تکنیک ELISA بر روی مایع برونشی آلوئولی (BAL, Bronchoalveolar Lavage) مصدومین شیمیائی سولفور موستارد مربوط به جنگ تحمیلی و افراد سالم انجام شد، مشخص گردید که مقدار پروتئین TGF- β 1 در مایع BAL افراد مصدوم افزایش یافته است [۱۵]. TGF- β 1 سیتوکین چند کاره ای (Multi Functional Cytokine) است که به صورت اتوکراین، پاراکراین و گاهی اندوکراین عمل کرده (۱۶) و مسئول تنظیم فرایندهای مختلفی از جمله هموستاز ماتریکس خارج سلولی، تکثیر سلولی، آپوپتوز، ترمیم زخم ها و آنژیوژنز می باشد (۱۷-۲۱). تمرکز ما در این مطالعه بر روی بررسی تغییرات ژن پائین دست TGF- β 1 که بر هموستاز ماتریکس خارج سلولی موثر است، بود.

ماتریکس خارج سلولی دارای وظایف مهمی می باشد که حمایت ساختاری (Structural Support)، اتصال سلول ها و ممانعت از حرکت ماکرومولکول ها و مایع خارج سلولی از مهمترین آنها است. سلول های موجود در هر بافت خاص دارای ترکیب ویژه ای از اجزای سازنده ماتریکس خارج سلولی می باشند که به اعمال تخصصی آنها کمک می کند (۱۰).

ماتریکس متالو پروتئینازها (MMPs, Matrix Metalloproteinases) مسئول تجزیه پروتئین های ماتریکس خارج سلولی و غشای پایه بوده و فعالیت آنها توسط مهار کننده های بافتی متالو پروتئینازها (TIMPs, Tissue Inhibitor of Metalloproteinases) کنترل می شود. خانواده ماتریکس متالو پروتئینازها (MMPs) یا ماتریکسین ها حاوی ۲۶ نوع اندوپپتیداز وابسته به روی (Zinc Dependent Endopeptidase) هستند که در pH خنثی فعالیت می کنند. بر اساس نوع سوستر، تشابه توالی و موتیف ها، MMP ها به چهار زیر گروه کلاژناز ها،

آمینی TIMP1 اسید آمینه سیستین (Cys) قرار دارد که با در بر گرفتن اتم روی MMP ها مانع عمل آنها می شود (۲۵).
 TGF- β 1 در حالت طبیعی بیان ژنهای MMP و TIMP را تنظیم کرده و بدین ترتیب تجزیه و تولید اجزای ماتریکس را در حالت تعادل نگه می دارد. افزایش یا کاهش بیان TGF- β 1 می تواند سبب به هم خوردن این تعادل شده و در نهایت منجر به ایجاد بیماری های مختلفی از جمله بیماری های ریوی گردد. در یک سری از مطالعات مشخص شده است که افزایش بیان TGF- β 1 منجر به افزایش بیان TIMP1 می شود [۱۰]. در این طرح با توجه به نقش کلیدی TIMP1 به عنوان یکی از اعضای مهم مهارکننده های بافتی متالوپروتیناز ها و نقش احتمالی که این ژن می تواند در پاتوژنز بیماری ریوی مصدومین شیمیائی داشته باشد به بررسی بیان و مقایسه آن در بین نمونه های ریوی گرفته شده از گروه مصدوم و کنترل پرداختیم.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه ها

جهت انجام این تحقیق نمونه های بافت های ریوی از بخش برونکوسکوپی مجتمع بیمارستانی بقیه ... الاعظم توسط پزشکان فوق تخصص ریه جمع آوری شدند. این نمونه گیری در فاصله زمانی آبان ۱۳۸۶ تا مرداد ۱۳۸۷ انجام شد. این نمونه ها به دو گروه مصدومین شیمیائی دارای سابقه مواجهه با سولفور موسنارد و افراد شاهد تفکیک شدند. گروه مصدومین شامل افرادی بودند که به دلیل ناراحتی های ریوی ناشی از مسمومیت قبلی با سولفور موسنارد و به دستور پزشکان فوق تخصص ریه تحت عمل برونکوسکوپی قرار گرفته بودند. گروه کنترل نیز شامل افرادی بودند که به منظور تشخیص بیماری ریه تحت عمل برونکوسکوپی قرار می گرفتند ولی هیچ گونه علائم بیماری های ریوی در آنها شناسائی نشد.

نمونه های بیویسی در میکروتیوب های استریل و عاری از RNase و در تانک ازت مایع قرار داده شد و پس از انتقال به آزمایشگاه، نمونه ها تا مرحله استخراج RNA، در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

استروملازین ها، ژلاتیناز ها و MMP های غشائی (MT-MMP) تقسیم می شوند. کلاژنازها شامل MMP1,8,13 است و کلاژن I, II و III، اگرکان، تناسکین و فیبرونکتین از مهمترین سوبسترا های این زیرگروه می باشد. استروملازین ها شامل MMP3,10,11 است که اجزای غشای پایه از جمله کلاژن III, IV و V، لامینین و فیبرونکتین را برش داده و تجزیه می کنند. ژلاتینازها (MMP2,9) نیز کلاژن IV و V، کلاژن دنا توره، السستین و اگرکان را تجزیه می کنند. MMP های ۱۴ الی ۲۵ جز گروه MT-MMP هستند و سوبستراهای این گروه متشکل از کلاژن I و III، اگرکان، تناسکین، نیدوزن و فیبرونکتین می باشند. همچنین ژیمورنهای بعضی از MMP ها نیز توسط این گروه به فرم فعال تبدیل می شود (۲۲، ۲۳).

TIMP ها مهارکننده های فیزیولوژیک متالوپروتیناز ها هستند و تاکنون چهار نوع از آنان شناسائی شده است که به صورت 4 و 3، 2، 1 TIMP نشان داده می شوند. TIMP1 و TIMP2 به صورت محلول به فضای بیرون سلولی ترشح می شوند، ولی TIMP3 به ماتریکس خارج سلولی متصل بوده و آزاد نیست. TIMP4 نیز به طور عمده در بافت عروقی یافت می شود. TIMP با MMP با نسبت ۱:۱ تشکیل کمپلکس داده و بدین ترتیب عمل پروتیناز مهار می شود. TIMP1 اکثر MMP ها را مهار کرده و همچنین پروتئین اصلی کنترل کننده فعالیت MMP9 (که نقش عمده ای در بیماری های مختلف ریه دارد) می باشد (۲۴).

ژن TIMP1 با طول ۴۵۰۱ جفت باز بر روی کروموزوم ۱۱ و درون اینترون شماره ۶ ژن سیناپسین قرار گرفته و دارای ۶ اگزون می باشد. بیان این ژن توسط سیتوکین ها و هورمون های متعددی کنترل می شود که TGF- β یکی از مهمترین آنها می باشد. پروتئین اولیه (proprotein) دارای ۱۸۴ اسید آمینه می باشد که ۲۳ اسید آمینه اول به عنوان پپتید نشانه عمل کرده و در حین ورود به شبکه آندوپلاسمی خشن (RER) از بقیه پروتئین جدا می شود. پروتئین بالغ TIMP1 به صورت گلیکوزیله بوده و وزن مولکولی آن ۲۸/۵ کیلو دالتون می باشد. این پروتئین به غیر از 19 و MMP14، بقیه MMP ها را مهار کرده و همچنین قادر است به فرم غیر فعال MMP9 (Pro-MMP9) نیز متصل شود. در انتهای

ملاحظات اخلاقی

برای رعایت مسائل اخلاقی، قبل از گرفتن نمونه؛ دلایل و علل نمونه گیری هم برای افراد بیمار و هم افراد کنترل کاملاً تشریح شده و با جلب رضایت این افراد و گرفتن رضایت نامه کتبی اقدام به نمونه گیری شد.

استخراج محتوای RNA ای واکنش رونویسی معکوس

محتوای RNA نمونه‌ها با استفاده از High pure RNA tissue kit (شرکت Roche) و بر اساس دستور العمل مربوطه از نمونه‌ها استخراج شد که به طور خلاصه شامل مراحل له کردن و هموژنیزاسیون نمونه‌های ریوی، افزودن بافر لیزکننده سلول، تیمار

واکنش های زنجیره ای پلیمرز PCR

با DNase، شستشو با بافر الکل دار و در نهایت جدا نمودن RNA تام بود. با استفاده از آنزیم ترانسکریپتاز معکوس (Fermantase) و الیگو dT(18) طبق پروتوکول مربوطه ۳-۵ µg از محتوای RNA ای هر نمونه برای ساخت cDNA استفاده شد.

به منظور ارزیابی نسبی بیان ژن TIMP1 در نمونه‌های ریوی از روش semi-quantitative RT-PCR استفاده شد. پرایمرهای مورد نیاز با استفاده از نرم افزار GENERUNNER طراحی شدند. توالی پرایمرها، دمای جفت شدن، طول محصول PCR، نام و شماره دسترسی به ژن‌های مورد نظر در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱

ژن	پرایمر	ترادف	دمای جفت شدن	طول محصول
TIMP1 (NM_003254)	F	AGACACCAGAGAACCCACCATGGC	۵۶	۶۷۳
	R	GCAGGCTTCAGCTTCCACTCCG	۵۶	
GAPDH (NM_002046)	F	CCAGCCGAGCCACATCGCTC	۵۶	۳۵۹
	R	ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT	۵۶	

پرایمرهای بالادست و پائین‌دست روی آگزون‌های جداگانه طراحی شدند؛ بدین ترتیب آن دسته از محصولات PCR که ناشی از آلودگی با DNA ژنومی باشند، به دلیل تفاوت اندازه قطعه تکثیر شده از محصول RT-PCR قابل تمایز بودند.

جهت تعیین دمای مناسب اتصال پرایمرها از گرادیان PCR برای ژن TIMP1 و ژن کنترل داخلی استفاده شد و در نهایت دمای ۵۶ درجه سانتی گراد برای هر دو این ژن‌ها انتخاب شد.

به منظور انجام semi-quantitative RT-PCR، تعداد سیکل مناسب برای هر کدام از ژن‌ها تعیین گردید. بدین منظور PCR در

سیکل‌های ۲۸ تا ۳۵ سیکل، انجام گرفت و در نهایت تعداد ۳۰ سیکل برای ژن کنترل داخلی (GAPDH) و ۳۵ سیکل برای ژن TIMP1 انتخاب شد.

محلول واکنش ۲۵ میکرولیتری PCR شامل ۱۰ میلی مول Tris-HCl، ۱/۵ میلی مول $MgCl_2$ ، ۴ میکرو مول از هر پرایمر، ۱۰۰ میکرو مول از مخلوط داکسی نوکلئوتید ها، ۲ میکرو لیتر از cDNA و یک واحد آنزیم Taq Polymerase (Cinagen) بود.

نتایج و بحث

به منظور بررسی نقش ژن *TIMP1* در بیماری مزمن ریوی مصدومین شیمیائی بیان این ژن در نمونه‌های ریوی مصدومین و افراد کنترل با استفاده از تکنیک semi-quantitative RT-PCR بررسی شد.

در تمام نمونه‌ها، از ژن *GAPDH* به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. واکنش PCR مربوط به این ژن‌ها و کنترل داخلی به دلیل تشکیل دایمر بین پرایمرهای دو ژن مورد بررسی در دو میکروتیوب جداگانه و در دما و سیکل‌های از قبل تعیین شده انجام شد. در هر آزمایش در کنار نمونه‌های تحت بررسی یک میکروتیوب نیز به عنوان کنترل منفی قرار داشت که در آن به جای نمونه cDNA از آب استریل استفاده شد.

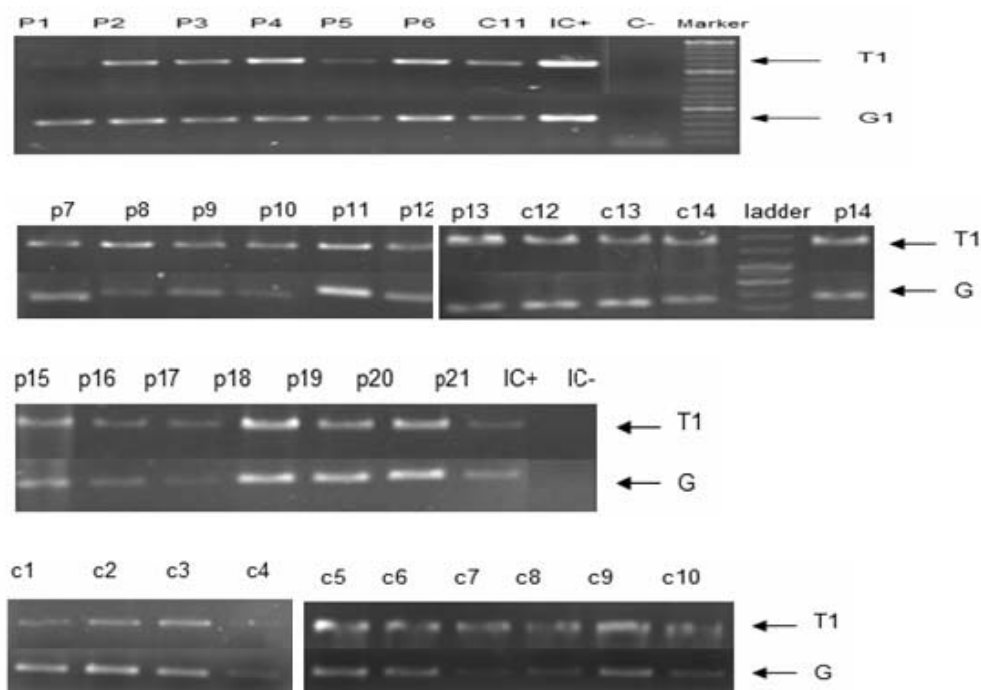
در مجموع ۲۱ نمونه بیمار و ۱۴ نمونه کنترل در این مطالعه بررسی شدند (شکل ۱). در تمامی این نمونه‌ها باند ۳۵۱ نوکلئوتیدی *GAPDH* تشخیص داده شد. از لحاظ آماری باند ۶۷۳ جفت بازی مربوط به *TIMP1* در ۹۳ درصد نمونه‌های کنترل و ۹۰ درصد نمونه‌های بیماران شیمیائی را شناسائی شد و در ادامه صحت باند مربوطه توسط هضم آنزیمی با آنزیم محدود کننده *HinfI* تأیید گردید (شکل ۲).

ابتدا مخلوط واکنش به مدت ۲ دقیقه در ۹۴ درجه سانتیگراد در دستگاه ترموسیکلر حرارت داده شد. سپس PCR با شرایط زیر به تعداد چرخه‌های از قبل تعیین شده انجام گرفت:

دناتوراسیون (Denaturation) در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، جفت شدن (Annealing) پرایمرها در ۵۶ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه و گسترش (Extension) در دمای ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه انجام شد. در نهایت یک مرحله گسترش نیز به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد.

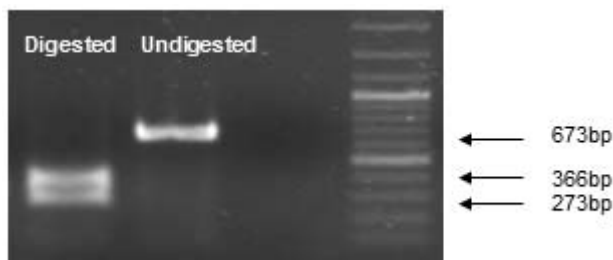
اندازه گیری شدت باندها و آنالیزهای آماری

محصولات PCR بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شده و بعد از آن ژل در محلول اتیدیوم برومید به مدت ۱۵ دقیقه رنگ آمیزی شد. سپس کلیه ژل‌های آگارز با استفاده از دستگاه Gel documentation (Uvitech، انگلستان) عکس‌برداری و شدت باندها با استفاده از نرم افزار Uvitech اندازه گیری شد. به منظور آنالیزهای آماری از آزمون T-مستقل (SPSS Software, Version 16) استفاده شد.



شکل ۱- مقایسه شدت نسبی بیان ژن *TIMP1* (T1, 673bp) در نمونه‌های ریوی افراد بیمار (P1-P21) و کنترل (C1-C14). باند

GAPDH (G, 359bp): ژن کنترل داخلی، IC+: کنترل مثبت PCR و IC-: کنترل منفی PCR

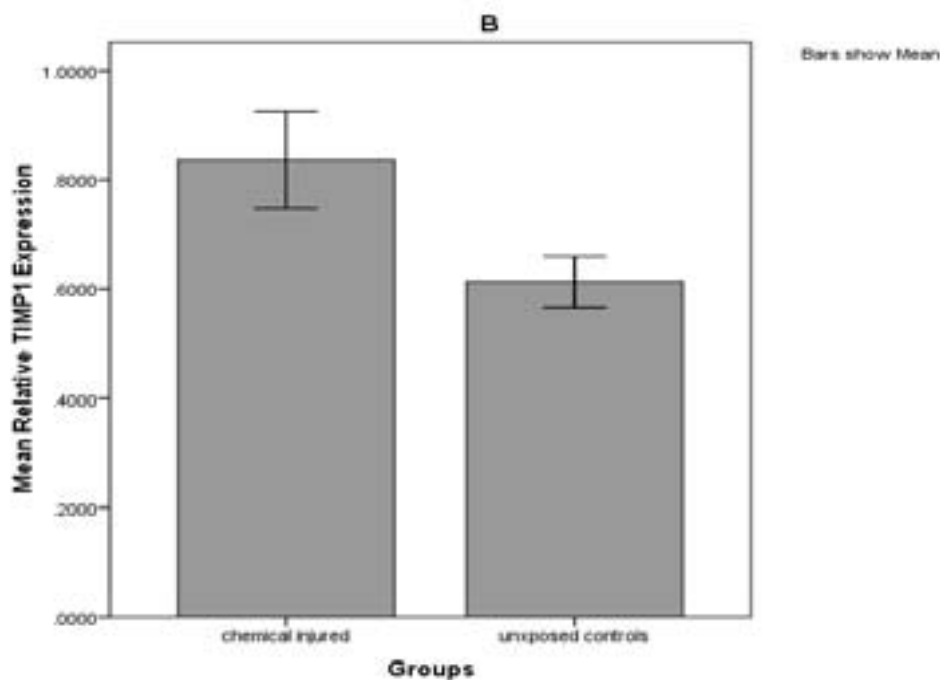
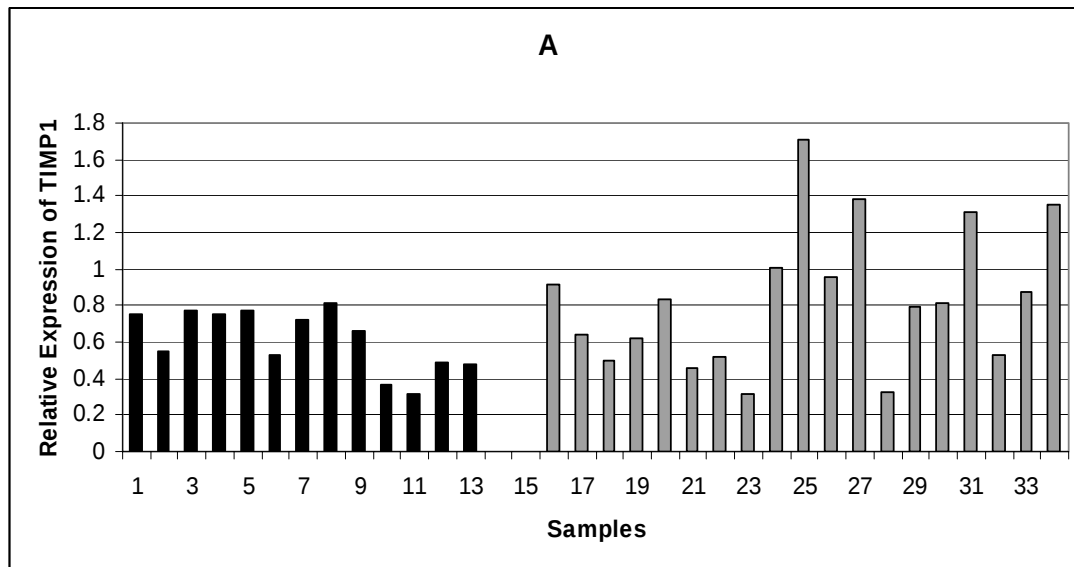


شکل ۲- نتایج هضم آنزیمی محصول PCR ژن *TIMP1* با آنزیم *Hinf1*، در اثر هضم قطعه ی کوتاهی به طول ۲۸ جفت باز نیز ایجاد می شود که به دلیل اندازه کوچک در ژل آگارز قابل تفکیک نبود.

استفاده شد. نتایج حاکی از این بود که بیان *TIMP1* به طور معنی داری در گروه بیماران شیمیائی افزایش یافته است ($P < 0.05$) (شکل ۳).

از آنجا که روش بررسی کمیت در این مرحله به صورت نسبی بود، مقایسه میزان بیان در بین دو گروه مختلف امکان پذیر بود. با توجه به اینکه آزمون کولموگروف-اسمیرنوف^۱، نرمال بودن توزیع میزان بیان نسبی ژن مورد مطالعه را نشان می داد، برای مقایسه بیان این ژن در بین دو گروه از آزمون آزمون T-مستقل

^۱ - Kolmogorov-Smirnov test



شکل ۳- شدت نسبی بیان ژن *TIMP1* در نمونه های کنترل و بیمار. A، شدت نسبی بیان ژن *TIMP1* در نمونه های کنترل (ستون های سیاه) و بیمار (ستون های خاکستری) را به تفکیک هر نمونه نشان می دهد. B، همین پارامتر را (با روی هم ریختن نمونه های هر گروه) نشان می دهد. اندازه گیری در هر نمونه به صورت نسبت شدت باند *TIMP1* به *GAPDH* می باشد و نتایج به صورت $MEAN \pm SEM$ نشان داده شده است.

منابع

1. Aghanouri R, Ghanei M, Aslani J, Keivani-Amine H, Rastegar F, Karkhane A (2004) Fibrogenic cytokine levels in bronchoalveolar lavage aspirates 15 years after exposure to sulfur mustard. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 287: L1160-1164.
2. Anthony E, Redington A, Madden J, Anthony JF, RATKO D, William RR, Stephan Th Peter HH (1997) Transforming Growth Factorb1 in Asthma, Measurement in Bronchoalveolar Lavage Fluid. *Am J Respir Crit Care Med*, 156: 642-647.
3. Asai K, Kanazawa H, Kamoi H, Shiraishi S, Hirata K Yoshikawa J (2003) Increased levels of vascular endothelial growth factor in induced sputum in asthmatic patients. *Clin Exp Allergy*, 33: 595-599.
4. Basile DP, Martin, DR Hammerman MR (1998) Extracellular matrix-related genes in kidney after ischemic injury: potential role for TGF-beta in repair. *Am. J. Physiol*, 275: 894-903.
5. Bassols A Massague J (1988) Transforming growth factor beta regulates the expression and structure of extracellular matrix chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans. *J.Biol. Chem*, 263: 3039-3045.
6. Bergeron C, Tulic MK, Hamid Q (2006) Tools used to measure airway remodelling in research. *European Respiratory Journal*, 29: 596-604.
7. Birkedal-Hansen H (1995) Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Current Opinion in Cell Biology*, 7: 728-735.
8. Boxall C, Holgate ST Davies DE (2005) The contribution of transforming growth factor-b and epidermal growth factor signalling to airway remodelling in chronic asthma. *European Respiratory Journal*, 27: 208-229.
9. Branton MH, B.Kopp J (1999) TGF- β and Fibrosis. *Microbes and Infection*, 1: 1349-1365.
10. Dickson M, Martin J, Cousins F, Kulkarni A, Karlsson S Akhurst R (1995) Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-b 1 knock out mice. *Development*, 121: 1845-1854.
11. Dijke Pt Arthur HM (2007) Extracellular control of TGF β signalling in vascular development and disease. *Nature reviews/ molecular cell biology*, 8: 857-869

نتایج حاصل از بررسی ما با نتایج مطالعات متعددی در خصوص بیان ژن *TIMP1* در بیماری‌های مختلف مطابقت دارد. مطالعات *Edwards* و همکاران (۱۹۹۶) نشان داد که افزایش بیان *TGF- β 1* می‌تواند منجر به افزایش پایداری و تجمع mRNA کد کننده *TIMP1* شود (۲۶). *Basile* و همکاران نشان دادند *TGF- β 1* در ترمیم آسیب نارسایی خون رسانی به کلیه نقش داشته و طی این روند نیز ژن *TIMP1* در پاسخ به *TGF- β 1* فعال می‌شود (۲۷). در بررسی که توسط *Eickelberg* و همکاران (۱۹۹۹) انجام گرفت مشخص شد که سلول‌های فیروبلست ریه انسان در پاسخ به *TGF- β 1* بیان ژن *TIMP1* و پایداری پروتئین حاصل را افزایش می‌دهند (۲۸). داده‌های این تحقیق پیشنهاد می‌کند که افزایش بیان *TIMP1* در ریه بیماران شیمیائی احتمالاً به دلیل افزایش *TGF- β 1* می‌باشد، به طوری که ابتدا در اثر آسیب به ریه *TGF- β 1* ترشح می‌شود که آن نیز به نوبه خود بیان ژن *TIMP1* را القا می‌کند. همچنین به نظر می‌رسد که افزایش *TIMP1* در ناحیه اپی‌تلیالی مجاری هوایی در بیماران شیمیائی منجر به کاهش تجزیه‌ی اجزای تشکیل دهنده ماتریکس خارج سلولی در سلول‌های این ناحیه می‌شود که به نوبه خود می‌تواند در باز آرائی مجاری هوایی و ایجاد بیماری مزمن ریوی (برونشیتولیت) نقش داشته باشد. به نظر می‌رسد که بررسی بیان ایزوفرم‌های *TGF- β 1* در نمونه‌های ریوی مصدومین شیمیائی و افراد مبتلا به سایر بیماری‌های ریوی نتایج ارزشمندی در پی داشته باشد.

سپاس گذاری

از کلیه بیماران که نمونه‌های ریوی آنها کلید انجام این پروژه بود، از دکتر اصلانی ریاست محترم دانشگاه علوم پزشکی بقیه ... و از پرسنل بخش اندوسکوپي بیمارستان بقیه ... که در تهیه نمونه‌های ریوی ما را یاری نمودند صمیمانه قدر دانی می‌گردد. از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس، مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیائی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ... و بنیاد ملی نخبگان که زمینه انجام این تحقیق را فراهم نمودند کمال تشکر به عمل می‌آید.

12. Edwards DR, Lecco KJ, Beaudry PP, Atadja PW, Veillette C Riabowol KT (1996) Differential effects of transforming growth factor-beta 1 on the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in young and old human fibroblasts. *Exp. Gerontol*, 31: 207-223.
13. Eickelberg O, Kohler E, Reichenberger F, S Bertschin, Woodtli T, Erne P, Perruchoud AP Roth M (1999) Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF-beta1 and TGF-beta3. *Am. J. Physiol*, 276: 814-824.
14. Ghanei M, Mokhtari M, Mohammad MM Aslani J (2004) Bronchiolitis obliterans following exposure to sulfur mustard: chest high resolution computed tomography. *Eur J Radiol*, 52: 164-169.
15. Ghanei M, Moqadam FA, Mohammad MM Aslani J (2006) Tracheobronchomalacia and air trapping following mustard gas exposure. *Am J Respir Crit Care Med*, 173: 304-309.
16. Ghanei M, Tazelaar HD, Chilosi M, Harandi AA, Peyman M, Akbari HM, Shamsaei H, Bahadori M, Aslani J Mohammadi A (2008) An international collaborative pathologic study of surgical lung biopsies from mustard gas-exposed patients. *Respir Med*, 102: 825-830.
17. Go'mez D, Alonso D, Yoshiji U Thorgeirsson P (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol*, 74: 111-122.
18. Kehe K Szinicz L (2005) Medical aspects of sulphur mustard poisoning. *Toxicology*, 214: 198-209.
19. Khateri S, Ghanei M, Keshavarz S, Soroush M Haines D (2003) Incidence of lung, eye, and skin lesions as late complications in 34,000 Iranians with wartime exposure to mustard agent. *J Occup Environ Med*, 45: 1136-1143.
20. Lagente V, Manoury B, Nénan S, Quément CL, Martin-Chouly C, Boichot E (2005) Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38: 1521-1530.
21. Lundblad KAL, Thompson-Figueroa J, Leclair T, Sullivan MJ, Poynter ME, Irvin CG Bates JHT (2005) Tumor Necrosis Factor Alpha Overexpression in Lung Disease, A Single Cause behind a Complex Phenotype. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 171: 1363-1370.
22. Maehara Y, Kakeji Y Kabashima A (1999) Role of transforming growth factor-b 1 in invasion and metastasis in gastric carcinoma. *J Clin Oncol*, 17: 607-614.
23. Matrisian LM (1992) The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays*, 14: 455-463.
24. Papirmeister B, Feister AF, Robinson SI Ford RD (1991) Medical Defense Against Mustard Gas: Toxic Mechanisms and Pharmacological Implications. CRC Press, Boca Raton, FL.
25. Ravitz M Wenner C (1997) Cyclin-dependent kinase regulation during G1 phase and cell cycle regulation by TGF-b. *Adv Cancer Res*, 71: 165-207.
26. Renshaw B (1946). Mechanism in production of cutaneous injuries by sulfur and nitrogen mustards. In: N. D. C. US Office of Scientific Research and Development, Chemical Warfare Agents and Related Chemical Problems, Washington DC, 479-518.
27. Torrego A, Hew M, Oates T, Sukkar M Chung KF (2007) Expression and activation of TGF-b isoforms in acute allergeninduced remodelling in asthma .*Thorax*, 62: 307-313.
28. Yang L, Qiu CX, Ludlow A, Ferguson MW, Brunner G, Weyand CF (1999) Active transforming growth factor-beta in wound repair: determination using a new assay. *Am. J. Pathol*, 154 105-111.