

بررسی اثر سولفورموستارد بر وضعیت متیلاسیون پروموتور ژن FOXP3 در جانبازان شیمیایی با عوارض تأخیری ریوی

نویسندگان: مریم خباره^۱، طوبی غضنفری^{۲*}، علیرضا ثابت پور^۳، سقراط فقیهزاده^۴، سارا غفارپور^۲

۱. گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی شاهد، تهران، ایران
۲. مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۳. فوق تخصص ریه، کالج سلطنتی متخصصان داخلی، لندن، انگلستان
۴. گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، ایران

E-mail: tghazanfari@yahoo.com

*نویسنده مسئول: طوبی غضنفری

چکیده

مقدمه و هدف: سولفورموستارد (SM) یک ماده شیمیایی و سمی است که در بروز عوارض ریوی و فرآیندهای التهابی در افراد مواجهه یافته با این گاز نقش مهمی دارد. FOXP3 یک فاکتور رونویسی مهم در عملکرد سلول‌های Treg است. تغییر الگوی متیلاسیون FOXP3 تحت تأثیر مواد شیمیایی و سمی باعث بروز بیماری‌های ریوی مزمن می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی اثر ماده‌ی شیمیایی و سمی SM بر وضعیت متیلاسیون پروموتور FOXP3 در جانبازان شیمیایی با عوارض تأخیری ریوی است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ۲۰ نفر مواجهه یافته با گاز خردل بعنوان گروه مورد و ۲۰ نفر سالم بعنوان گروه کنترل می‌باشند. DNA از نمونه‌های خون استخراج گردید. وضعیت متیلاسیون پروموتور ژن FOXP3 از طریق تست Methylation specific PCR (MSP) بررسی گردید.

نتایج: در متیلاسیون ژن FOXP3 بین دو گروه اختلاف معناداری وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: وضعیت متیلاسیون ژن FOXP3 در گروه مواجهه یافته خفیف و متوسط تغییر معناداری پیدا نکرده است. به منظور یافتن نقش این ژن در پاتولوژی ریه مصدومین شیمیایی نیاز به سنجش سایر فاکتورهای اپی‌ژنتیکی و بررسی‌های بیشتر وجود دارد.

واژگان کلیدی: سولفورموستارد، عوارض ریوی، متیلاسیون، FOXP3

دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌وششم - شماره ۱۳۸
دی ۱۳۹۷

دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۲۱

آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۷/۱۰/۰۱

پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۰۸

مقدمه

مناطق قرار گرفته‌اند. در سال‌های اخیر اهمیت متیلاسیون در بیماری‌های التهابی مزمن ریوی مطرح شده است. مطالعات نشان می‌دهد که مواجهه با مواد سمی و شیمیایی مختلف باعث ایجاد اختلال در متیلاسیون ژن FOXP3 و بروز بیماری‌های التهابی مزمن می‌شود (۱۲). با توجه به اینکه علائم مزمن مواجهه با سولفورموستارد و بیماری‌های مزمن ریوی تشابه نسبی دارند و با توجه به وجود شرایط التهابی مزمن در ریه‌ی خردلی و نقش مهم FOXP3 در التهاب مزمن ریوی و تأثیر مواد شیمیایی و سمی بر وضعیت متیلاسیون این ژن، در این مطالعه تأثیر ماده‌ی شیمیایی و سمی SM بر روی متیلاسیون ژن FOXP3 در مصدومین شیمیایی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

جامعه آماری و نمونه مورد مطالعه

در این مطالعه‌ی مورد شاهدی، ۲۰ نفر افراد مواجهه یافته با سولفورموستارد در گروه مورد و ۲۰ نفر افراد سالم در گروه کنترل، مورد مطالعه قرار گرفتند. هر دو گروه از نظر سن، جنس و خصوصیات دموگرافیک همسان‌سازی شدند. در گروه مورد، افرادی که مواجهه‌ی آن‌ها به تأیید کمیسیون پزشکی بنیاد شهید و امور ایثارگران رسیده است و دارای مشکلات ریوی هستند، با رضایت فردی وارد مطالعه شدند. سن افراد بین ۳۵ تا ۶۵ سال بوده و به بیماری زمینه‌ای خاصی مبتلا نبودند. هیچ یک از افراد شرکت‌کننده در مطالعه سابقه مصرف سیگار را نداشته‌اند. بررسی بالینی و تست‌های اسپرومتری و HRCT^۲ به منظور تشخیص عوارض ریوی در گروه مواجهه یافته، توسط پزشکان فوق تخصص ریه انجام شد و گروه کنترل از نظر سلامت عمومی بررسی گردیدند. این مطالعه به تصویب کمیته‌ی اخلاق پژوهش‌های زیست پزشکی دانشگاه شاهد با کد کمیته‌ی اخلاق IR.shahed.REC.1396.127 رسیده است.

سولفورموستارد^۱ (SM) یک عامل آلکیل کننده قوی با ویژگی‌های کارسینوژنیک، سایتوتوکسیک و موتاژنیک است که دارای آثار کوتاه‌مدت (حاد) و بلندمدت (تأخیری) بر چشم، پوست، سیستم عصبی و به خصوص ریه‌ها است. ریه شایع‌ترین عضو درگیر در مصدومین شیمیایی مواجهه یافته با سولفورموستارد است (۱) و احتمالاً عملکرد نابجای سیستم ایمنی و التهاب در بروز مشکلات تأخیری نقش دارند (۲،۳). بیماری‌های انسدادی مجاری تنفسی شامل برونشیت مزمن، برونکواسپاسم، آسم، برونشکتازی، فیروز ریوی، COPD^۲، برونشولیت ابلترانس از جمله عوارض تأخیری در ریه مصدومین شیمیایی است (۴-۶). مصدومین مواجهه یافته با گاز خردل با افراد دارای بیماری COPD، برونشولیت ابلترانس و آسم از جهت نشانه‌های کلینیکی و فرآیندهای ایمونوپاتوژنز و پاتوفیزیولوژیکال شباهت‌های نسبی دارند (۷-۹). ریه خردلی، یک بیماری ناهمگن (Heterogeneous) است که با پاسخ‌های ناهنجار التهابی ارتباط دارد. سلول‌های CD4⁺ CD25⁺ Treg (FOXP3⁺) که بعنوان سلول‌های اثرگذار در تحمل محیطی عمل می‌کنند و باعث جلوگیری از مداومت التهاب می‌شوند، در ایمونوپاتوژنز بیماری‌های التهابی همچون COPD، IPF^۳، و آسم نقش اساسی و کلیدی را ایفا می‌کنند (۱۰). FOXP3 یک فاکتور رونویسی مهم و حیاتی در عملکرد سلول‌های Treg محسوب می‌شود (۱۱). پدیده‌های اپی ژنتیکی منجر به تغییرات در بیان ژن و ساختار کروماتین بدون تغییر در توالی DNA می‌شوند. متیلاسیون DNA یک فاکتور مهم اپی ژنتیکی است که مستقیماً DNA را تحت تأثیر قرار می‌دهد و حاصل انتقال یک گروه متیل از s-آدنوزیل متیونین به کربن شماره ۵ باز سیتوزین است و ارتباط بیشتری با بیان ژن دارد. جزایر CpG، مناطق غنی از دی نوکلئوتیدهای CpG هستند که حدود ۷۰ درصد پروموتورهای انسانی در این

1. Sulfur mustard

2. Chronic Obstructive Pulmonary Disease

3. Idiopathic pulmonary fibrosis

4. High Resolution Computed Tomography of the Chest (HRCT)

جمع آوری نمونه

نمونه‌گیری از افراد مراجعه‌کننده به کلینیک ریه بیمارستان ساسان تهران انجام گرفت. ۲.۵ میلی‌لیتر خون محیطی از افراد گرفته شد.

استخراج DNA و تیمار با سدیم بی‌سولفیت

DNA ژنومی از هر نمونه با استفاده از روش salting out (نمک اشباع) استخراج شد. کیفیت DNA استخراج‌شده با استفاده از دستگاه نانودراپ بررسی شد و DNA در دمای 20°C - ذخیره گردید. تیمار DNA با بی‌سولفیت سدیم با استفاده از کیت Epi Tect Bisulfite (کایژن، آلمان) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. تیمار DNA با بی‌سولفیت منجر به تبدیل سیتوزین غیر متیله به یوراسیل می‌شود، درحالی‌که سیتوزین متیله بدون تغییر باقی می‌ماند. DNA بی‌سولفیت شده در دمای 20°C - نگهداری گردید. پس از تیمار با بی‌سولفیت سدیم از روش methylation specific polymerase chain reaction (MSP) جهت بررسی وضعیت متیلاسیون استفاده شد. در این مطالعه کنترل متیله با استفاده از آنزیم MssI و کنترل غیر متیله با استفاده از آنزیم Phi29 (هر دو ساخته شرکت Thermo Scientific، لیتوانی) طبق دستورالعمل شرکت سازنده آماده گردید.

PCR اختصاصی متیلاسیون (MSP)

برای تعیین وضعیت متیلاسیون DNA در جزایر CpG

نواحی پرموتری ژن FOXP3 از روش کیفی MSP استفاده گردید. جهت انجام این تست از پرایمرهای متیله و غیرمتیله (۱۷۰) استفاده گردید (جدول ۱). به منظور دستیابی به توالی پرموتری این ژن از سایت UCSC و جهت بررسی کیفیت پرایمرها از نرم‌افزار Gene Runner استفاده شد. بعد از انجام بررسی‌های لازم بهترین پرایمر انتخاب گردید. از مستر میکس TEMPase Hot Start 2x Master Mix A (امپلیکون، دانمارک) برای انجام واکنش PCR استفاده شد. برنامه دمایی و زمانی هر یک از مراحل PCR به ترتیب زیر تنظیم شد: یک انکوباسیون ۱۵ دقیقه ای در دمای 95°C و به دنبال آن ۳۵ سیکل شامل یک دناتوراسیون ۳۰ ثانیه‌ای در دمای 95°C ، ۳۰ ثانیه در دمای اتصال پرایمرها به DNA هدف (69°C) برای پرایمر متیله و 70°C برای پرایمر غیرمتیله ژن FOXP3) و یک پلیمرزاسیون ۳۰ ثانیه‌ای در دمای 72°C و یک پلیمرزاسیون نهایی در دمای 72°C به مدت ۵ دقیقه انجام شد. DNA کاملاً متیله و DNA کاملاً غیر متیله به ترتیب بعنوان کنترل مثبت و منفی استفاده شد. مقدار ۵ میکرولیتر از محصول PCR جهت مشاهده‌ی باندهای مربوط به ژن، روی ژل آگارز ۲ درصد بارگذاری شد. یافته‌ها بصورت فراوانی و درصد نمایش داده شد.

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای ژن FOXP3

	توالی	پرایمر
متیله - FOXP3	5'- AGAGGTTTAAAAAGTGGGAGATTTTC-3'	فوروارد متیله
	5'- ATTAACCTCGCTACAACCATTATTCGT-3'	ریورس متیله
غیرمتیله - FOXP3	5'-AGAGGTTTAAAAAGTGGGAGATTTT-3'	فوروارد غیرمتیله
	5'-TTAACTCACTACAACCATTATCATC-3'	ریورس غیرمتیله

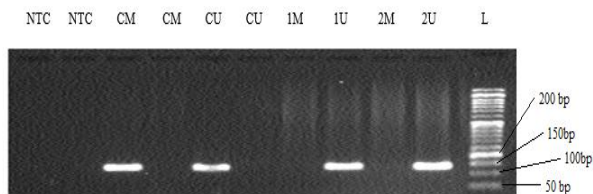
نتایج

دو گروه وجود داشت ($P < 0.001$). اطلاعات دموگرافیک دو گروه در جدول ۲ آمده است. نسبت جذب A260 به A280 نمونه‌های DNA، 0.2 ± 0.2 بود.

میانگین سنی بیماران مواجهه یافته $52/53 \pm 2/93$ سال و در گروه کنترل میانگین سنی $41/90 \pm 8/48$ سال در زمان نمونه‌گیری بوده است که اختلاف معناداری بین

جدول ۲. یافته‌های دموگرافیک گروه‌های مورد مطالعه

گروه		تعداد	میانگین	انحراف معیار	p-Value
سن	کنترل	۲۰	۴۱/۹۰	۸/۴۸	* < ۰/۰۰۱
	مواجهه یافته	۱۹	۵۲/۵۳	۲/۹۳	
ایندکس توده بدنی	کنترل	۱۱	۸۱/۵۵	۱۰/۸۶	۰/۷۰۲
	مواجهه یافته	۱۹	۸۳/۵۳	۱۴/۸۱	



(ب)

شکل ۱. واکنش MSP پروموتور ژن FOXP3 در گروه مواجهه یافته (الف) و کنترل (ب).

در این تصویر چاهک ۱ و ۲ به ترتیب بعنوان کنترل منفی (NTC) برای پرایمر متیله و غیرمتیله و چاهک ۳ و ۴ بعنوان کنترل متیله (CM) به ترتیب با پرایمر متیله و غیرمتیله و چاهک ۵ و ۶ به عنوان کنترل غیرمتیله (CU) به ترتیب با پرایمر غیرمتیله و متیله است. در چاهک‌های ۷ الی ۱۰، محصول MSP به ترتیب توسط پرایمرهای متیله (M) و غیر متیله (U) برای نمونه DNA گروه مواجهه یافته (الف) و گروه کنترل (ب) است.

نتایج حاصل از تست MSP نشان می‌دهد که جایگاه مورد بررسی در پروموتور ژن FOXP3 در هر دو گروه ۱۰۰٪ هیپو متیله است (جدول ۳) و هیچ اختلاف معناداری بین دو گروه وجود ندارد. برای حذف اثر مخدوش گر سن از آنالیز کوواریانس (ANCOVA) استفاده شد ($P = ۰/۹۶۶$).

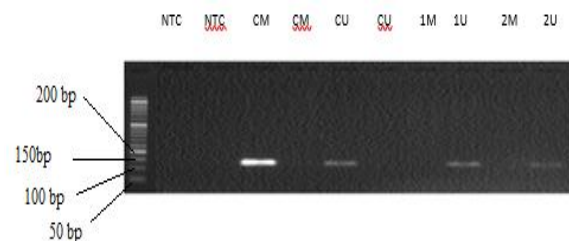
جدول ۳. نتایج فراوانی حاصل از واکنش MSP ژن

FOXP3		
متیلاسیون	مواجهه یافته N(%)	کنترل N(%)
دارد	۰(٪۰)	۰(٪۰)
ندارد	۲۰(٪۱۰۰)	۲۰(٪۱۰۰)

مقایسه بین گروه‌های کنترل و مواجهه یافته برای هر کدام از پارامترهای سنجش شده است که p-value کمتر از ۰/۰۵ بعنوان سطح معنادار در نظر گرفته می‌شود.

نتایج واکنش MSP

در این مطالعه روش MSP برای تعیین وضعیت متیلاسیون پروموتور ژن FOXP3 مورد استفاده قرار گرفت. پس از تیمار نمونه‌های DNA با بی‌سولفیت، واکنش MSP توسط دو نوع پرایمر متیله و غیرمتیله انجام گرفت. نتایج به دست آمده در شکل ۱ آورده شده است. با توجه به نتایج به دست آمده هیچ بانندی در چاهک‌های مرتبط با پرایمر متیله (همچون چاهک ۷ و ۹ شکل ۱) در گروه مواجهه یافته و گروه کنترل مشاهده نشد. در نتیجه بخشی از توالی پروموتوری ژن FOXP3 که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته است، در نمونه‌های گروه مواجهه یافته و کنترل، غیر متیله است. طول محصولات واکنش MSP برای پرایمرهای متیله ۱۲۰ bp و پرایمرهای غیرمتیله ۱۱۶ bp بود. با توجه به طول قطعات سائز مارکر ۵۰ bp انتخاب شد.



(الف)

بحث

اخیراً مطالعات زیادی تعاملات بین فاکتورهای شیمیایی، محیطی و اپیژنتیکی را مطرح می‌کنند و اختلالات اپیژنتیکی ناشی از عوامل محیطی در بروز بیماری‌های مختلف از جمله سرطان ریه، COPD و آسم را نشان می‌دهند (۱۳). متیلاسیون بعنوان یک فاکتور مهم اپیژنتیک، تحت تأثیر مواد شیمیایی و سمی دچار اختلال و تغییر الگو می‌شود (۱۴).

ریه خردلی، یک بیماری ناهمگن (Heterogeneous) است که با پاسخ‌های ناهنجار التهابی ارتباط دارد. مواجهه یافتگان با سولفورموستارد با بیماران مبتلا به COPD، آسم، برونشولیت ابلیرانس تشابهاتی دارند (۸). سلول‌های $Treg(CD4^+ CD25^+ FOXP3^+)$ که بعنوان سلول‌های اثرگذار در تحمل محیطی عمل می‌کنند و باعث جلوگیری از مداومت التهاب می‌شوند، در ایمونوپاتوژنز بیماری‌های التهابی همچون IPF، COPD و آسم نقش اساسی و کلیدی را ایفا می‌کنند (۱۰). FOXP3 یک فاکتور رونویسی مهم و حیاتی در عملکرد سلول‌های Treg محسوب می‌شود (۱۱). در مطالعه‌ای که توسط ایمانی و همکاران انجام گرفته است، نشان دادند که بیان این فاکتور رونویسی در بیوپسی transbronchial جانبازان شیمیایی و بیماران مبتلا به COPD کاهش یافته است (۱۶). متیله شدن FOXP3 در مناطق CpG این ژن باعث نقص در عملکرد سلول‌های Treg می‌شود. مطالعات مختلفی تغییر الگوی متیلاسیون ژن FOXP3 را در مواجهه با مواد شیمیایی و سمی مختلف مطرح می‌کنند. این مطالعات نشان می‌دهند که، اختلال در متیلاسیون ژن FOXP3 موجب اختلال در عملکرد سلول‌های Treg و بروز بیماری‌های التهابی مزمن همچون آسم می‌شوند (۱۷). در مطالعه‌ای حاضر، متیلاسیون ناحیه پرموتوری ژن FOXP3 بررسی گردید و هیچ اختلاف معناداری در متیلاسیون این ژن بین گروه مواجهه یافته با سولفورموستارد و گروه کنترل مشاهده نشد و این جایگاه در تمام نمونه‌ها هیپومتیله بوده است. در مطالعه‌ی کوهیل و همکاران، افزایش متیلاسیون ژن

FOXP3 و کاهش بیان این ژن در نمونه سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی افراد مواجهه یافته با دود سمی سیگار و آلاینده‌های محیطی نشان داده شد و تأثیر هایپرمتیلاسیون ژن FOXP3 در بروز اختلال در عملکرد سلول‌های Treg گزارش شده است (۱۲). همچنین در مطالعه دیگری، نادا و همکاران به بررسی اثر آلاینده‌های محیطی بر متیلاسیون ژن FOXP3 در بیماران مبتلا به آسم پرداختند. مطالعات آن‌ها نشان داد که ژن FOXP3 در مواجهه با این مواد شیمیایی دچار متیلاسیون شده است و نقص در عملکرد Treg پیامد این متیلاسیون است. همچنین آنان دریافتند که متیلاسیون این ژن و نقص در عملکرد سلولی و سرکوبگری سلول‌های Treg با شدت بیماری آسم در این بیماران رابطه‌ی مستقیم دارد (۱۷).

مطالعه‌ی حاضر، جزایر CpG نواحی پرموتوری ژن FOXP3 را مورد بررسی قرار داده است. پرموتر ژن FOXP3 در انسان، حاوی جایگاه‌های اتصال برای فاکتورهای رونویسی مختلفی همچون NF-AT و AP-1 است که در تنظیم بیان FOXP3 نقش دارند. کانگ و همکاران در مطالعه‌ی خود نشان دادند که متیله شدن نواحی CpG در پرموتر ژن FOXP3 باعث اختلال در عملکرد سرکوبگری سلول‌های Treg می‌شود و با بروز نوعی بیماری کبدی ارتباط مستقیم دارد (۱۸).

در این پژوهش وضعیت متیلاسیون FOXP3 به صورت کیفی گزارش شد. در اینجا به مقایسه مطالعه حاضر با سایر بیماری‌ها در وضعیت متیلاسیون پرموتر این ژن می‌پردازیم. مطالعه‌ی حاضر به بررسی وضعیت یکی از مکانیسم‌های اپیژنتیکی در نمونه‌های جانبازان شیمیایی پرداخته است. مکانیسم‌های دیگری همچون تغییرات اپیژنتیکی هیستون‌ها مانند استیلاسیون نیز در بیان ژن‌ها نقش دارند. ماتل و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند که هایپر استیلاسیون H4 در پرموتر و مناطق کروماتینی ژن FOXP3 باعث فعال شدن رونویسی از این ژن می‌گردد (۱۹). همچنین کاواسانی و همکاران نشان دادند که استیلاسیون هیستون H3 در موقعیت لایزین ۹

عوارض ریوی خفیف و متوسط بوده و این موضوع نشان می‌دهد که ممکن است در گروه مواجهه یافته با عوارض ریوی شدید، سولفورموستارد بر روی وضعیت متیلاسیون این ژن اثر داشته باشد. تفاوت الگوی سلولی و مولکولی ریه خردلی با سایر بیماری‌های التهابی مانند COPD و آسم می‌تواند دلیل دیگری بر علت تفاوت نتایج مطالعه‌ی حاضر با سایر بیماری‌ها باشد. قانعی و همکاران در مطالعه‌ی نشان دادند که واسطه‌های التهابی همچون IL-6 و IL-8 در COPD افزایش یافته است و با شدت بیماری رابطه‌ی مستقیم دارد و بعنوان یک بیومارکر برای تشخیص این بیماری محسوب می‌شود (۲۳) اما پورفرزام و همکاران نشان دادند که در بیماری‌های ریوی ناشی از سولفورموستارد سطح سرمی IL-6 و IL-8 کاهش یافته و هیچ اختلاف معناداری بین این فاکتورها و علائم و شدت عوارض ریوی وجود ندارد (۲۴).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که وضعیت متیلاسیون ژن FOXP3 در اثر مواجهه با سولفورموستارد در مصدومین شیمیایی با عوارض ریوی خفیف و متوسط تغییر معناداری پیدا نکرده است و احتمالاً مکانیسم‌های دیگری در بیان این ژن دخیل هستند. برای مشخص شدن اثرات سولفورموستارد بر روی متیلاسیون و نقش آن در پاتولوژی ریه مصدومین شیمیایی نیاز به سنجش سایر فاکتورهای اپی‌ژنتیکی و بررسی‌های بیشتر وجود دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد است و با حمایت مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی انجام شده است.

باعث باز شدن کروماتین و در دسترس قرار گرفتن پروموتور ژن FOXP3 و اتصال فاکتورهای رونویسی به پروموتور و در نتیجه، افزایش بیان FOXP3 می‌شود. همچنین، علاوه بر پروموتور ژن FOXP3، جایگاه‌های دیگری که دارای نواحی CpG هستند، در این ژن وجود دارد. در قسمتی از لوکوس ژنی FOXP3، مناطق غیرکننده و حفاظت‌شده‌ای (CNS2) وجود دارد که در بردارنده‌ی یک ناحیه‌ی اختصاصی و غنی از CpG بنام سلول‌های Treg کاملاً دمتیله است. این ناحیه علاوه بر اینکه بعنوان یک enhancer در تنظیم اپی‌ژنتیکی FOXP3 عمل می‌کند، در حفظ پایداری بیان FOXP3 نیز نقش مهمی دارد. متیلاسیون این نواحی مانع اتصال فاکتورهای رونویسی همچون REL، STAT5 و کمپلکس CBFβ - RUNX1 می‌شود که برای بیان پایدار FOXP3 ضروری هستند (۲۰).

علت دیگر می‌تواند عدم وجود گروه‌بندی افراد مواجهه یافته به گروه‌های خفیف، متوسط و شدید باشد. مطالعه‌ی پورفرزام و همکاران نشان داد که در گروه مواجهه یافته با عوارض ریوی شدید، از نظر یافته‌های اسپرومتری و علائم ریوی در مقایسه با گروه کنترل، اختلاف معنادار وجود دارد و این در حالی است که بین گروه خفیف و متوسط نسبت به گروه کنترل هیچ‌گونه اختلاف معناداری وجود نداشت. در مطالعه‌ی غفارپور و همکاران نیز افزایش سطح سرمی MMP-9 در گروه مواجهه یافته با عوارض ریوی شدید نشان داده شد، درحالی‌که در گروه خفیف و متوسط اختلاف معناداری مشاهده نشده است (۲۱). همسو با این مطالعات، ایوبی و همکاران نیز افزایش میزان کموکاین SDF-1α^۲ در جانبازان با آسیب ریوی شدید نسبت به گروه کنترل را نشان داده و عدم وجود تفاوت معنادار میزان این کموکاین نسبت به گروه کنترل را گزارش کردند (۲۲). افراد گروه مواجهه یافته در مطالعه‌ی حاضر نیز دارای

¹. Conserved non-coding sequences

². Stromal-Derived Factor 1α

منابع

- Balali-Mood M, Hefazi M, Mahmoudi M, Jalali E, Attaran D, Maleki M, et al. Long-term complications of sulphur mustard poisoning in severely intoxicated Iranian veterans. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 2005;19(6):713-21.
- Javadi M-A, Yazdani S, Sajjadi H, Jadidi K, Karimian F, Einollahi B, et al. Chronic and delayed-onset mustard gas keratitis: report of 48 patients and review of literature. *Ophthalmology* 2005;112(4):617-25. e2.
- Vosoughi A, Baghaei A, Esmaeeli A. Type IV skin test reaction in mustard gas exposed patients 2000.
- Balali-Mood M, Hefazi M. Comparison of early and late toxic effects of sulfur mustard in Iranian veterans. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2006;99(4):273-82.
- Ghanei M, Harandi AA. Long term consequences from exposure to sulfur mustard: a review. *Inhalation Toxicology* 2007;19(5):451-6.
- Balali-Mood M, Afshari R, Zojaji R, Kahrom H, Kamrani M, Attaran D, et al. Delayed toxic effects of sulfur mustard on respiratory tract of Iranian veterans. *Human & Experimental Toxicology* 2011;30(9):1141-9.
- Imani S, Panahi Y, Salimian J, Fu J, Ghanei M. Epigenetic: A missing paradigm in cellular and molecular pathways of sulfur mustard lung: a prospective and comparative study. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 2015;18(8):723.
- Panahi Y, Jadidi-Niaragh F, Azimzadeh Jamalkandi S, Ghanei M, Pedone C, Nikravanfard N, et al. Immunology of chronic obstructive pulmonary disease and sulfur mustard induced airway injuries: implications for immunotherapeutic interventions. *Current Pharmaceutical Design* 2016;22(20):2975-96.
- Khateri S, Ghanei M, Keshavarz S, Soroush M, Haines D. Incidence of lung, eye, and skin lesions as late complications in 34,000 Iranians with wartime exposure to mustard agent. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* 2003;45(11):1136-43.
- Imani S, Salimian J, Bozorgmehr M, Vahedi E, Ghazvini A, Ghanei M, et al. Assessment of Treg/Th17 axis role in immunopathogenesis of chronic injuries of mustard lung disease. *Journal of Receptors and Signal Transduction* 2016;36(5):531-41.
- Rudensky AY. Regulatory T cells and Foxp3. *Immunological Reviews* 2011;241(1):260-8.
- Kohli A, Garcia MA, Miller RL, Maher C, Humblet O, Hammond SK, et al. Secondhand smoke in combination with ambient air pollution exposure is associated with increased CpG methylation and decreased expression of IFN- γ in T effector cells and Foxp3 in T regulatory cells in children. *Clinical Epigenetics*. 2012;4(1):17.
- Kabesch M, Adcock IM. Epigenetics in asthma and COPD. *Biochimie* 2012;94(11):2231-41.
- Baccarelli A, Bollati V. Epigenetics and environmental chemicals. *Current Opinion in Pediatrics* 2009;21(2):243.
- Saber H, Saburi A, Ghanei M. Clinical and paraclinical guidelines for management of sulfur mustard induced bronchiolitis obliterans; from bench to bedside. *Inhalation Toxicology* 2012;24(13):900-6.
- Imani S, Salimian J, Fu J, Ghanei M, Panahi Y. Th17/Treg-related cytokine imbalance in sulfur mustard exposed and stable chronic obstructive pulmonary (COPD) patients: correlation with disease activity. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 2016;38(4):270-80.
- Nadeau K, McDonald-Hyman C, Noth EM, Pratt B, Hammond SK, Balmes J, et al. Ambient air pollution impairs regulatory T-cell function in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2010;126(4):845-52. e10.
- Li K, Zhang X, Yang L, Wang X-x, Yang D-h, Cao G-q, et al. Foxp3 promoter methylation impairs suppressive function of regulatory T cells in biliary atresia. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2016;311(6):G989-G97.

19. Mantel P-Y, Ouaked N, Rückert B, Karagiannidis C, Welz R, Blaser K, et al. Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *The Journal of Immunology* 2006;176(6):3593-602.
20. Polansky JK, Kretschmer K, Freyer J, Floess S, Garbe A, Baron U, et al. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *European Journal of Immunology* 2008;38(6):1654-63.
21. Ghaffarpour S, Ghazanfari T, Ardestani SK, Pourfarzam S, Fallahi F, Shams J, et al. Correlation between MMP-9 and MMP-9/TIMPs Complex with Pulmonary Function in Sulfur Mustard Exposed Civilians: Sardasht-Iran Cohort Study. *Archives of Iranian Medicine (AIM)* 2017;20(2).
22. Ayubi F, Ghazanfari T, Askari N, Naghizade MM, Soroush MR. Serum level of SDF-1 α (CXCL12) in chemical victims with respiratory complications. *Iranian Journal of War and Public Health* 2014;6(2):55-63.
23. Ghanei M, Harandi AA. Molecular and cellular mechanism of lung injuries due to exposure to sulfur mustard: a review. *Inhalation Toxicology* 2011;23(7):363-71.
24. 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. *International Immunopharmacology*. 2009;9(13-14):1482-8.

Received: 13/10/2018

Last revised: 22/12/2018

Accepted: 29/12/2018

Evaluation of sulfur mustard effect on the methylation status of FOXP3 gene promoter in chemical victims with pulmonary delayed complications

Maryam Khabareh¹, Tooba Ghazanfari^{2*}, Alireza Sabetpour³, Soghrat Faghihzadeh⁴, Sara Ghaffarpour²

1. Medical Faculty, Shahed University, Tehran, Iran.
2. Immunoregulation Research Center, Shahed University, Tehran, Iran.
3. Pulmonologist, London, UK.
4. Statistical and Epidemiological Department, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

* Corresponding author e-mail: tghazanfari@yahoo.com

Abstract

Background and Objective: Sulfur mustard (SM) is a toxic and chemical agent. The incidence of pulmonary complications and inflammatory processes play an important role in SM-exposed individuals. FOXP3 is one of the important factors in the development of chronic pulmonary diseases. FOXP3 gene promoter due to exposure to chemical and toxic materials leads to chronic pulmonary disease. In this study, the effect of toxic sulfur mustard was evaluated on the promoter methylation status of FOXP3 in SM-exposed individuals with delayed pulmonary complications.

Materials and Methods: In this case-control study, 20 SM exposed cases and 20 unexposed as control were studied. DNA was extracted from blood samples. Methylation specific PCR(MSP) was used to evaluate promoter methylation status of FOXP3.

Results: There was no significant difference between the promoter methylation status of FOXP3 in the exposed group as compared to control group.

Conclusion: The methylation status of the FOXP3 gene did not significantly change after exposure to sulfur mustard and other mechanisms might be involved in expressing this gene. To determine the effect of SM on methylation and its role in the pathogenesis of chemical victims' lung complications, it is needed to measure other epigenetic factors and further studies.

Keywords: Sulfur mustard, Pulmonary complication, Methylation, FOXP3