بیان ژن فاکتور رشد تغییردهنده‌ی بتا ۱ (TGF-β1) و ارتباط آن با میزان خارش در ضایعات پوستی جانبازان شیمیایی مواجهه یافته با گاز خردل

دکتر عیسی خواهشی[۱و۲]
دکتر سعید کشاورز[۱]
دکتر مجید شهرتی[۱]
دکتر عباسعلی فولادی ایمانی[۱]
دکتر محمدرضا نورانی[۱]

۱. مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... (عج)، تهران، ایران
۲. دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

نویسنده مسؤول:
دکتر محمدرضا نورانی

تهران، خیابان ملاصدرا، بیمارستان بقیه‌الله، پست الکترونیک:
r.nourani@yahoo.com

زمینه و هدف: گاز خردل به‌عنوان گاز تاول‌زا موجب آسیب‌های متنوعی در اعضای مختلف بدن از جمله پوست می‌شود که موجب تغییر در اجزای سلولی از جمله DNA و تظاهرات بالینی شایع از جمله خارش مزمن می‌گردد. ملکول TGF-β1 به‌عنوان یک سیتوکین با اعمال متنوع از جمله مهار رشد سلولی و تعدیل و سرکوب التهاب نقش مهمی در پروسه التهاب پوستی ایفا می‌کند به‌طوری‌که نقش ضدالتهابی این ملکول و گیرنده‌های آن در التهاب پوستی و بیماری‌های شایع دیده شده است. هدف از انجام این مطالعه، بررسی بیان ژن TGF-β1 در جانبازان شیمیایی مواجهه‌یافته با گاز خردل و رابطه آن با شدت خارش آنان بود.

روش اجرا: ۱۷ جانبار شیمیایی مواجهه یافته با گاز خردل، ۱۷ بیمار با درماتیت تماسی مزمن و ۱۰ فرد سالم وارد مطالعه شدند. ارزیابی بیان ژن TGF-β1 در نمونه پوستی آن‌ها توسط RT-PCR نیمه‌کمی و متعاقب آن توسط ایمونوهیستوشیمی و طبقه‌بندی بیماران براساس سیستم نمره‌دهی شدت خارش (۳-۰) انجام گرفت.

یافته‌ها: کاهش معنی‌داری در درصد بیان و شدت بیان ژن TGF-β1 در گروه مصدومین شیمیایی در مقایسه با گروه درماتیت تماسی مزمن و گروه سالم دیده شد ($P<۰/۰۵$). هم چنین با عدم بیان ژن TGF-β1، شدت خارش در گروه بیماران به‌طور معناداری افزایش یافت ($P<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: فاکتور رشد تغییردهنده‌ی بتا ۱ (TGF-β1) نقش قابل‌توجهی را در ضایعات التهابی پوستی مزمن ناشی از گاز خردل ایفا می‌کند.

کلیدواژه‌ها: فاکتور رشد تغییردهنده‌ی بتا ۱، سیتوکین، گاز خردل، خارش

دریافت مقاله: ۸۹/۶/۲۷ پذیرش مقاله: ۸۹/۹/۸
پوست و زیبایی؛ زمستان ۱۳۸۹، دوره‌ی ۱(۴): ۱۷۱-۱۶۲

مقدمه

گاز خردل یا گاز موستارد یک گاز تاول‌زاست که به‌عنوان سلاح شیمیایی برای اولین بار در جنگ جهانی اول (۱۹۱۷) و در طول جنگ تحمیلی عراق علیه ایران (۱۹۸۸-۱۹۸۰) به‌کار برده شده است که منجر به ۱۰۰۰۰۰ مجروح شیمیایی در کشورمان گردیده است. درحال‌حاضر یک سوم از این مجروحین از عوارض ثانویه‌ی گاز خردل رنج می‌برند[۱و۲]. گاز خردل توانایی ایجاد آسیب در اعضای مختلف بدن و به‌ویژه در پوست، دستگاه تنفسی و چشم‌ها را دارد، که عموماً عوارض خود را از طریق پتانسیل آلکیله‌کردن اجزای سلولی مانند RNA و DNA انجام داده و منجر به آسیب‌های سلولی در سطح ژنتیک و متابولیک می‌شود[۱و۳-۶].

در پوست، کراتینوسیت‌ها به‌ویژه در لایه‌ی پایه‌ای پوست هدف اصلی گاز خردل جهت آلکیلاسیون و تغییرات ثانوی آن می‌باشند[۴-۷]. به‌طوری‌که تظاهرات مزمن شایع این گاز در پوست، شامل قرمزی، خشکی،

هیپو و هیپرپیگمانتاسیون، درماتیت تماسی و خارش مزمن می‌باشد که مورد آخر یعنی خارش مزمن، تأثیر واضحی در کیفیت زندگی مجروحین دارد [۸-۱۱].

از طرف دیگر سیتوکین‌ها، نقش کلیدی در روندهای التهابی حاد و مزمن پوستی مانند درماتیت مزمن متعاقب گاز خردل و علل دیگر بازی می‌کنند [۱۲-۱۷]. یکی از مهم‌ترین این سیتوکین‌ها، فاکتور تغییردهنده‌ی رشد بتا (TGF-β)، یک ملکول پروتئینی با وزن ملکولی ۲۵ کیلودالتون می‌باشد [۱۸و۱۹]. این فاکتور دارای ۳ ایزوفرم (۳، ۲، ۱ TGF-β) بوده و از طریق دو رسپتور غشایی ۱ و ۲ (۲ و ۱ TR) پیام خود را به داخل سلول می‌رساند [۲۰] که مسیر پیام‌رسانی داخل سلولی این فاکتور توسط ملکول‌های Smad تسهیل شده و پیام مربوطه نهایتاً به هسته‌ی سلول رسیده و منجر به تغییراتی در تنظیم در سطح رونویسی DNA می‌گردد [۲۱-۲۶].

TGF-β یک فاکتور با اعمال متنوع می‌باشد که طیف آن از تمایز سلولی و مهار رشد سلولی تا تحریک ماتریکس خارج سلولی و تعدیل و سرکوب پاسخ‌های ایمنی و التهابی متغیر می‌باشد، که از سلول‌های مختلفی از جمله سلول‌های T، ماکروفاژها، کراتینوسیت‌ها و فیبروبلاست‌ها ترشح می‌گردد [۲۷-۲۹].

گزارش‌هایی وجود دارد که مطرح کننده‌ی اثر ضدالتهابی و تعدیل‌کنندگی فاکتور TGF-β در التهاب پوستی مزمن و حاد می‌باشد که اثر کلیدی در تظاهرات پوستی و شکایات بیماران از جمله خارش مزمن ایفا می‌کند [۲۰و۲۶و۳۰-۳۷].

برای ارزیابی نقش احتمالی TGF-β در ضایعات پوستی التهابی مزمن ایجاد شده توسط گاز خردل و ارتباط آن با خارش مزمن بیماران به‌عنوان یک شکایت بالینی عمده، بیان ژن ایزوفرم ۱ فاکتور تغییردهنده‌ی رشد بتا (TGF-β1) در سطح RNA و پروتئین مورد بررسی قرار گرفته و با گروه‌های کنترل مقایسه گردید.

روش اجرا

گرفتن نمونه‌ها و بررسی بالینی

در این مطالعه‌ی مقطعی (cross sectional) ۱۷ جانباز شیمیایی که ضایعات اثبات‌شده‌ی پوستی ناشی از گاز خردل داشتند (میانگین سن ۹/۳±۴۸/۴۷ سال، حداکثر سن ۶۹ و حداقل سن۴۲)، ۱۷ بیمار درماتیت تماسی تحریکی مزمن بدون سابقه‌ی مواجهه با گاز خردل (میانگین سن ۱۴/۶±۴۶/۵۲ سال، حداکثر سن ۶۷ و حداقل سن ۳۸) و ۱۰ فرد کاملاً سالم (میانگین سن ۱۴/۶±۴۴ سال، حداکثر سن ۵۸ و حداقل سن ۳۲) که همه جنس مذکر داشتند، وارد مطالعه گردیدند.

بیماران با سن زیر ۲۰ سال و یا بالای ۷۰ سال، سابقه‌ی مصرف سیگار و نیز سابقه‌ی مصرف داروهای موضعی در طول ۱ ماه گذشته، از مطالعه حذف شدند و از تمامی بیماران رضایت‌نامه‌ی کتبی بعد از توضیح‌دادن مراحل مطالعه، گرفته شد.

شدت خارش بیماران به‌وسیله‌ی سیستم نمره‌دهی براساس پرسش از بیماران از ۰ تا ۳ تعیین شد: نمره‌ی ۰ بدون خارش، نمره‌ی ۱ خارش ملایم بدون اختلال واضح در فعالیت‌های روزمره، نمره‌ی ۲ خارش متوسط با اختلال واضح در فعالیت‌های روزمره و نمره‌ی ۳ خارش شدید که منجر به اختلال در خواب شبانه نیز شده است.

نمونه‌های بیوپسی از ضایعه‌ی پوستی به قطر ۳ میلی‌متر توسط پانچ بیوپسی گرفته شد و در محلول تریزول (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) جهت استخراج RNA و محلول ۴٪ فرمالدئید جهت بررسی ایمونوهیستوشیمی نگهداری شد. محلول تریزول ابتدا به دمای $-20^{o}C$ و سپس به $-80^{o}C$ انتقال یافت، در حالی که محلول فرمالدئید در دمای داخل یخچال نگهداری شد.

استخراج RNA

نمونه‌های پوستی داخل محلول تریزول، به‌وسیله‌ی دستگاه هموژنایز اولتراسونیک، هموژن شد. و بعد از اضافه‌کردن ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم (Merk, Germany) و سانتریفوژ در دور ۱۲۰۰۰ rpm، مایع بی‌رنگ رویی به‌دست‌آمده که حاوی RNA می‌باشد، جدا و معادل حجم آن ایزوپروپرانولول اضافه شد و به‌دنبال آن سانتریفوژ انجام‌شده و رسوب RNA به‌دست‌آمده در اتانول ۷۵٪ حل شده و مجدداً با دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد که نهایتاً RNA تخلیص شده در ۲۰ میکرولیتر آب فاقد RNAase حل شده و مقدار و درجه‌ی خلوص آن توسط دستگاه نانودراپ ND (NanoDrop) (1000UV-spectrophotometer) موردارزیابی قرار گرفت.

طراحی پرایمر

پرایمرژن TGF-β1 و ژن B-actin به‌عنوان ژن کنترل طراحی شد که در جدول ۱ نشان داده شده‌است.

ساختن cDNA و انجام Semi quantitative RT-PCR

۵۰۰ نانوگرم از کل RNA به‌دست‌آمده که با آب فاقد RNAase تیمار شده، مطابق پروتکل کیت ساخت cDNA و توسط ترانس‌کریپتاز معکوس (Invitrogen)، مورد رونوشت برداری معکوس قرار گرفت. ۱ میکرولیتر از cDNA به‌دست‌آمده جهت انجام واکنش PCR به محلول حاوی ۲/۵ میکرولیتر بافر(Takara)، ۵ pm دئوکسی‌نوکلئوزیدتری‌فسفات (dNTP)، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq پلی‌مراز (Cinagene) و ۱۰ pm پرایمر اضافه شد. واکنش PCR در محلول ذکر شده، در دمای ۹۵°C برای ۳ دقیقه جهت شروع، ۹۵°C برای ۳۰ ثانیه جهت دناتوره‌کردن، ۵۹°C برای ۳۰ ثانیه به‌عنوان دمای بهینه‌ی هر کدام از ژن‌های TGF-β1 و β-actin، ۷۲°C برای ۱ دقیقه جهت اکستانسیون، ۷۲°C برای ۵ دقیقه جهت اکستانسیون نهایی و دمای نهایی ۴°C، انجام شد. محصولات PCR در ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شد و باندهای موردنظر، بعد از اضافه‌کردن اتیدیوم بروماید جهت رنگ‌کردن، زیر نور فرابنفش قابل‌مشاهده و بررسی بودند. نتایج بیان ژن TGF-β1 با بیان ژن β-actin به‌عنوان کنترل، موردمقایسه قرار گرفت. تحلیل تصاویر به‌دست آمده توسط نرم‌افزار Scion (Scioncorporation, Frederick, MD) جهت به‌دست‌آوردن داده کمی از بیان ژن TGFβ1 (توسط فرمول TGF-β1/β-action) برای هر نمونه انجام شد.

ایمونوهیستوشیمی

برای نمونه‌های بیوپسی قرار داده‌شده در فرمالدئید ۴ ٪ جهت تثبیت، مراحل ایمونوهیستوشیمی مطابق پروتکل مربوطه[۳۸] انجام شد.

آنتی بادی‌های به‌کارگرفته شده در مطالعه جهت ایمونوهیستوشیمی شامل Anti-TGFβ1 با منشأ انسانی(Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) به‌عنوان آنتی‌بادی اولیه و آنتی‌بادی مونوکلونال IgG1 با منشأ موش، به‌عنوان آنتی‌بادی ثانویه (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) بودند. به‌طوری که در سایت‌های واکنش آنتی‌ژن ـ آنتی‌بادی با استفاده از سیستم ABC Complex

جدول ۱: طراحی پرایمر و توالی ژن TGF-β1 و β-actin

نام ژن	توالی	دمای بهینه	سایز محصول
TGF-β1Forward Primer	5'TCAAGCAGAGTACACACAGC3'	۵۹°C	۲۴۲ bp
TGF-β1 Reverse Primer	5'GCACAACTCCGGTGACATC3'	۵۹°C	
B-actin Forward Primer	5'TCATGAAGATCCTCACCGAG3'	۵۹°C	۱۹۰ bp
β-actin Reverse Primer	5'TTGCCAATGGTGATGACCTG3'	۵۹°C	

(avidin-biotinylatedperoxidase) قابل‌جست‌وجو و بررسی بودند.

تحلیل داده‌ها

داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس (ANOVA)، دستور Bonferroni و آزمون Chi^2 توسط نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۵ (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) موردتحلیل قرارگرفت. سطح معناداری یافته‌ها $P<۰/۰۵$ بوده و تمامی نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار نمایش داده شده‌اند.

یافته‌ها

بالینی

براساس مقیاس سنجش میزان خارش، بیماران شیمیایی (با گاز خردل) همه دارای خارش شدید (یعنی نمره‌ی ۳) بودند. درحالی‌که در گروه بیماران درماتیت تماسی تحریکی مزمن ۱۷/۶٪ دارای خارش ملایم (نمره‌ی ۱)، ۲۹/۴٪ دارای خارش متوسط (نمره‌ی ۲) و۵۳٪ دارای خارش شدید (نمره‌ی ۳) بودند. میزان خارش به‌طور معناداری در بیماران شیمیایی (با گاز خردل) شدیدتر از بیماران درماتیت تماسی تحریکی مزمن بود ($P=۰/۰۱$). میانگین مدت ابتلا به خارش در جانبازان شیمیایی۱/۴±۲۴ سال (با توجه به مصدوم‌شدن در سال‌های ۶۶-۶۴) بود. ولی میانگین مدت ابتلا به خارش در بیماران درماتیت تماسی تحریکی مزمن ۱/۱±۲ سال بود ($P=۰/۰۰۱$).

ملکولی

تنها ۲ مورد از ۱۷ مورد مصدوم شیمیایی (۱۱/۷٪) ژن TGF-β1 را بیان کردند، درحالی‌که ۱۰ مورد از ۱۷ مورد بیمار درماتیت تماسی مزمن (۵۹٪) و ۸ مورد از ۱۰ مورد از افراد سالم (۸۰٪) ژن مربوطه را بیان نمودند. بیان ژن TGF-β1 در گروه جانبازان شیمیایی به‌طور معناداری پایین‌تر از دو گروه دیگر می‌باشد ($P=۰/۰۰۲$) (شکل ۱).

شدت بیان ژن TGF-β1 در گروه مصدومین شیمیایی ۰/۰۳۶±۰/۰۴ (با حداکثر ۰/۰۷۶ و حداقل ۰/۰۰۰)، در گروه درماتیت تماسی مزمن ۰/۰۹۶±۰/۲۹ (با حداکثر ۰/۳۷ و حداقل ۰/۰۰۰) و در گروه نرمال ۰/۲۹±۰/۴۴ (با حداکثر ۰/۷۱ و حداقل ۰/۰۰۰) بود که به‌طور معناداری در گروه مصدومین شیمیایی پایین‌تر از دو گروه دیگر می‌باشد ($P=۰/۰۰۸$).

ارتباط یافته‌های بالینی و ملکولی

به‌عنوان یافته‌ی ابتدایی، عدم بیان ژن TGF-β1 در اکثر نمونه‌های مصدومین شیمیایی با خارش شدید (نمره ۳) دیده می‌شود.

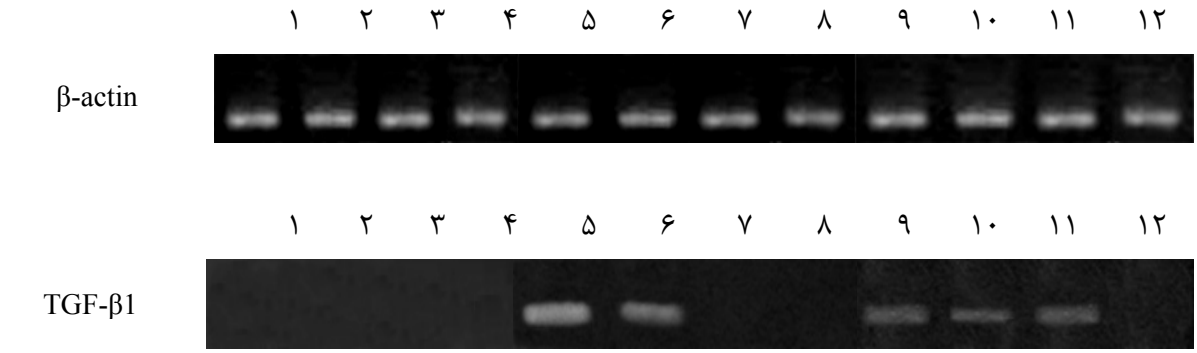
هم چنین با بررسی دو گروه بیمار (مصدومین شیمیایی و درماتیت تماسی مزمن) و ارزیابی ارتباط شدت خارش و بیان یا عدم بیان ژن TGF-β1 این نتیجه حاصل می‌گردد که با عدم بیان ژن TGF-β1، شدت خارش افزایش می‌یابد ($P=۰/۰۳۱$).

یافته‌های ایمونوهیستوشیمی

در گروه نرمال در تمام لایه‌های پوست به‌ویژه اپی‌درم واکنش واضح به آنتی‌بادی TGF-β1 دیده شد. در گروه درماتیت تماسی مزمن، واکنش واضح تنها در لایه‌ی سلول‌های پایه‌ای اپی‌درم دیده شده و عکس‌العمل معناداری در لایه‌های بالایی اپی‌درم و نیز درم مشاهده نگردید. در گروه مصدومین شیمیایی با گاز خردل، عکس‌العمل بسیار ضعیفی که در حد رنگ زمینه می‌باشد به آنتی‌بادی TGF-β1 دیده شد (شکل ۲).

بحث

یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که عدم بیان ژن TGF-β1 به‌طور کاملاً واضحی در گروه مصدومین شیمیایی بیشتر از گروه‌های درماتیت تماسی مزمن و نرمال می‌باشد.



شکل ۱: الکتروفورز ژن‌های TGF-β1 و β-actin متناظر در جانبازان شیمیایی (۴-۱)، بیماران درماتیت تماسی مزمن (۸-۵) و افراد عادی (۱۲-۹).

ضمناً، موارد خارش شدید نیز به‌طور معناداری در گروه جانبازان شیمیایی بالاتر می‌باشد.

اثرات گاز خردل بر روی التهاب پوستی و سیتوکین‌های التهابی در مطالعات متعددی مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. در یک مطالعه‌ی حیوانی تأثیر گاز خردل بر روی پوست موش و نقش IL-6 به‌عنوان یک بیومارکر پیش التهابی که بیان آن افزایش می‌یابد مورد ارزیابی قرار گرفت[۱۲و۱۳]. در مطالعه‌ی دیگری، بیان ژن سیتوکین‌های التهابی (IL-1B, GM-CSF, IL-6) که در اثر مواجهه‌ی گاز خردل با پوست افزایش می‌یابد، مورد بررسی قرار گرفته است[۱۴].

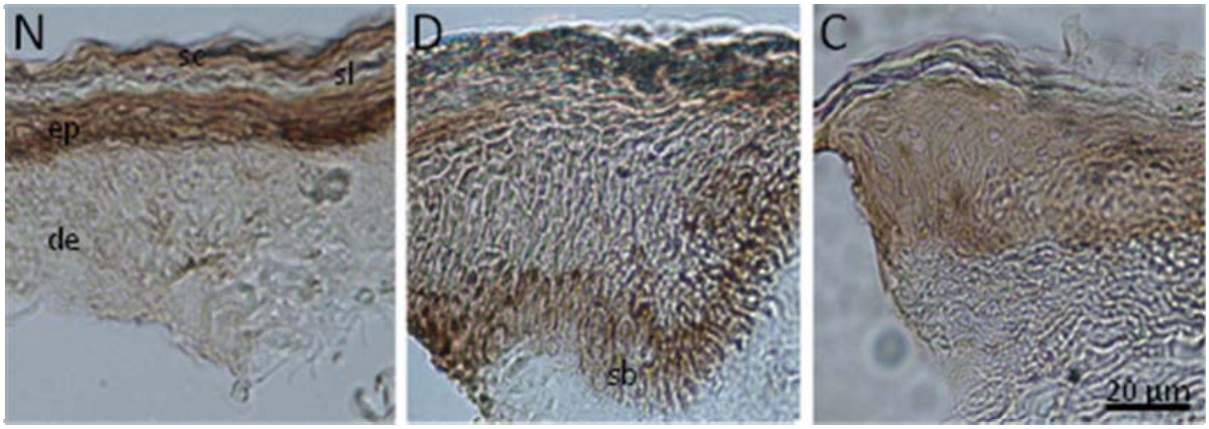
TGF-β به‌عنوان یک فاکتور تعدیل‌کننده و سرکوب‌کننده‌ی التهابی مطرح می‌باشد. به‌طوری‌که مطالعات حیوانی ضایعات التهابی مشخص را در پوست و سایر اعضای در موش‌های فاقد ژن TGF-β گزارش نموده‌اند[۲۹و۳۴].

این نتیجه با نتیجه‌ی به‌دست‌آمده از مطالعه‌ی حاضر، که دلالت بر عدم بیان ژن TGF-β1 در ضایعات پوستی جانبازان شیمیایی و متعاقب آن عوارض و تظاهرات بالینی از جمله خارش مزمن، هم‌خوانی دارد.

اهمیت نقش ضدالتهابی TGF-β در مطالعات دیگری با بررسی مسیر پیام‌رسانی داخل سلولی آن از طریق ملکول‌های Smad موردتأکید قرار گرفته است. که این گزارش‌ها نیز بر این واقعیت تأکید دارند که TGF-β و ملکول‌های داخل سلولی Smad پیام‌رسان آن، نقش ویژه‌ای در تعدیل التهاب در درماتیت تماسی و آتوپیک برعهده دارند. به‌طوری‌که آتش التهابی برافروخته شده توسط سایر سیتوکین‌های التهابی و کموکین‌ها را تعدیل و شاید سرکوب می‌کنند[۴۰-۴۲]. برای مطالعات آینده، ملکول‌های Smad اهداف مناسبی برای ارزیابی در ضایعات پوستی مزمن جانبازان شیمیایی خواهند بود.

مطالعات متنوعی بیان ژن TGF-β و رسپتورهای آن را در پوست نرمال و در لایه‌های مختلف آن ارزیابی کرده‌اند که بیشتر آنها بیان ژن مذکور و رسپتورهای آن را در سطح mRNA و یا پروتئین شناسایی کرده و نشان داده‌اند[۴۳-۴۶]. در مطالعه‌ی حاضر نیز، ژن TGF-β1 در اکثر نمونه‌های نرمال در سطح mRNA و نیز پروتئین قابل‌ارزیابی و نمایش بوده است.

ماتریکس متالوپروتئینازها نیز در پروسه‌ی التهابی ایجاد شده توسط گاز خردل نقش مهمی را ایفا می‌کنند[۴۷]. مطالعات دیگری نشان داده است که TGF-β نقش مهاری علیه ماتریکس متالوپروتئینازها در پروسه‌ی التهاب دارد[۲۸و۴۸].



شکل ۲: ایمونوهیستوشیمی TGF-β1 پوست عادی (N)، درماتیت مزمن (D) و جانباز شیمیایی (C) با درشت‌نمایی ۴۰ برابر. sc=stratum corneum ،sb=stratum basal ،de=dermis ،ep=epidermis ،sl=stratum lucidum

در مطالعه‌ی دیگری بر نقش مهاری IL-10 (که اعمال مشابه با TGF-β در سرکوب التهاب دارد) در ضایعات پوستی ناشی از گاز خردل تأکید شده است که به‌طور غیر مستقیم بر نقش مهار کنندگی التهاب توسط TGF-β و IL-10 و متعاقب آن تظاهرات شایع از جمله خارش مزمن تأکید دارد[۳۹].

مطالعه‌ی دیگری نیز تقویت مسیر TGF-β و Smad را در درمان درماتیت آتوپیک مؤثر می‌داند که مجددا بر نقش ضدالتهابی این ملکول تأکید دارد [۴۲].

در نهایت، مطالعات دیگری نیز با تمرکز بر نقش یک‌سری از داروها روی ترشح و القای TGF-β بر نقش ضدالتهابی آن صحه گذاشته‌اند. به‌طوری‌که رتینوئیک اسید (Vit A) با القای ترشح TGF-β می‌تواند اثرات مهاری خود را در التهاب و تکثیر بیش از حد در پوست ایفا نماید[۴۹-۵۱]. در مورد Calcipotriol (Vitamin D_3) نیز چنین روند مشابهی به چشم می‌خورد[۵۲]. در مطالعات جالب دیگری، پماد تاکرولیموس، به‌عنوان آزادکننده و القاءکننده‌ی TGF-β در سلول‌های پوستی مطرح شده است که اعمال ضدالتهابی خود را در درمان درماتیت، از طریق TGF-β انجام می‌دهد[۵۳و۵۴]. که این یافته‌ها نیز مجدداً بر نقش تعدیل‌گری و ضدالتهابی TGF-β در ضایعات پوستی و تظاهرات آن از جمله خارش، تأکید دارند. مطالعات درمانی ذکر شده می‌توانند در مطالعات آینده با هدف قراردادن ملکول TGF-β و مسیر پیام‌رسانی آن در کاهش و یا درمان تظاهرات شایع و آزاردهنده از جمله خارش مزمن بیماران شیمیایی مؤثر واقع گردند[۵۵].

به‌طور خلاصه، بسیاری از بیماران شیمیایی با گاز خردل ژن TGF-β1 را بیان نکردند به‌طوری‌که به‌صورت متناسبی همه‌ی آنها از خارش شدید به‌عنوان شکایت اصلی رنج می‌بردند.

با این وجود، اطلاعات دقیق و جزءبه‌جزء درباره‌ی اثرات گاز خردل بر روی پوست انسانی، به‌ویژه در سطح ملکولی بسیار محدود بوده و مطالعه‌ی حاضر با حجم نمونه‌ی نسبتاً اندک، نمی‌تواند به همه‌ی سؤالات درباره‌ی این موضوع، جواب روشنی ارائه دهد. اما می‌تواند به‌عنوان یک پنجره‌ی جدید برای مطالعات و پژوهش‌های بیشتر بر روی فرآیندهای ملکولی گاز خردل در ضایعات پوستی مزمن و تظاهرات بالینی ناشی از آن و بررسی‌های بیشتر بر روی رویکردهای درمانی جهت این ضایعات به‌شمار آید.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از زحمات همکار مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، آقای دکتر یونس پناهی قدردانی می‌گردد. با تشکر از همکاری فنی و آزمایشگاهی آقای مجید ابراهیمی و خانم سمانه یزدانی، این پروژه تحت حمایت کامل مرکز آسیب‌های شیمیایی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج) به انجام رسیده است.

References

1. Kehe K, Szinicz L. Medical aspects of sulphur mustard poisoning. J Toxicol 2005; 214: 198-209.
2. Khateri S,Ghanei M, Keshavarz S, et al. Incidence of lung, eye, and skin lesions as late complications in 34,000 Iranians with wartime exposure to mustard agent. J Occup Environ Med 2003; 45: 1136-43.
3. Goodman LS. Use of methyl-bis (beta-chloroethyl) amine hydrochloride and tris (beta-chloroethyl) amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. JAMA 1984; 251: 2255-61.
4. Papirmeister B. Pathology produced by sulfur mustard in human skin grafts on athymic nude mice II. J Toxicol 1984; 3: 393-408.
5. Marrs TT, Maynard RL, Sidell FR. Chemical warfare agents. Toxicology and treatment. Chichester: Wiley; 1996.
6. Somani SM. Chemical warfare agents. New York: Wiley; 1992.
7. Petrali JP, Oglesby SB, Justus TA. Morphologic effects of sulfur mustard on a human skin equivalent. J Toxicol 1991; 10: 315-24.
8. Momeni AZ, Enshaeih SH, Meghdadi M, et al. Skin manifestations of mustard gas. A clinical study of 535 patients exposed to mustard gas. Arch Dermatol 1992; 128: 775-80.
9. Hefazi M, Maleki M, Mahmoudi M, et al. Delayed complications of sulfur mustard poisoning in the skin and the immune system of Iranian veterans 16-20 years after exposure. Int J Dermatol 2006; 45: 1025-31.
10. Weisshaar E, Diepgen TL. Pruritus and quality of life [Abstract]. J Invest Dermatol 2005; 125: 855.
11. Skoet R, Zachariae R, Agner T. Contact dermatitis and quality of life: A structured review of the literature. Br J Dermatol 2003; 149: 452-6.
12. Arroyo CM, Schafer RJ, Kurt EM, et al. Response of normal human keratinocytes to sulfur mustard: Cytokine release. J Appl Toxicol 2000; 20: 63-72.
13. Ricketts KM, Santai CT, France JA, et al. Inflammatory cytokine response in sulfur mustard-exposed mouse skin. J Appl Toxicol 2000; 20: 73-6.
14. Sabourin CL, Petrali JP, Casillas RP. Alterations in inflammatory cytokine gene expression in sulfur mustard-exposed mouse skin. J Biochem Mol Toxicol 2000; 14: 291- 302.
15. Hunter J, Savian J, Dahl M (eds). Clinical dermatology. Denmark: Blackwell Publishing; 2002.
16. Thestrup Pedersen K, Larsen CG, Ronnevig J. The immunology of contact dermatitis: A review with special refrences to the pathophysiology of eczema. Contact dermatitis 1989; 20: 81-92.
17. Keratinocyte cytokines. In: Nozaki S, Feliciani C, Sauder D, (eds). Advances in dermatology. St. Louis: Mosby Year Book; 1991.

18. Clark DA, Coker R. Transforming growth factor-beta (TGF-β). Int J Biochem Cell Biol 1998; 30: 293-8.
19. Roberts AB. Molecular and cell biology of TGF-β. Miner Electrolyte Metab 1998; 24: 111-9.
20. Wrana JL. TGF-β receptors and signaling mechanisms. Miner Electrolyte Metab 1998; 24: 120-30.
21. Derynk R, Zhang Y, Feng XH. Smads: Transcriptional activators of TGF- beta responses. Cell 1998; 95: 737- 40.
22. Derynck R, Zhang YE. Smad dependent and Smad independent pathway in TGF- beta family signalling. Nature 2003; 425: 577-84.
23. Moustakas A. Smad signalling network. J Cell Sci 2002; 115: 3355-6.
24. Souchelnytskyi S, Rönnstrand L, Heldin CH, Tendijke P. Phosphorylation of Smad signaling proteins by receptor serine/threonine kinases. Methods Mol Biol 2001; 124: 107-20.
25. Wrana J, Attisano L, Wieser R, et al. Mechanism of activation of the TGF-β receptor. Nature 1994; 370: 341-7.
26. Nakao A, Imamura T, Souchelnytskyi S. TGF-β receptor-mediated signaling through Smad2, Smad3 and Smad4. J EMBO 1997; 16: 5353-62.
27. Abbas AK, Litchman Ah, Pilai S. Cellular and molecular immunology. Philadelphia: Elsevier; 2003
28. Tissue repair: Regeneration, healing and fibrosis. In: Kumar V, Abbas Ak, Fausto N, Mitchell R, (eds). Robbins basic pathology. Philadelphia: Saunders; 2007: 63-5.
29. Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF- beta. Annu Rev Immunol 1998; 16: 137-61.
30. Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta in T- cell biology. Nat Rev Immunol 2002; 2: 46-53.
31. Bogand C, Nathan C. Modulation of macrophage function by transforming growth factor beta, interleukin- 4, and interleukin- 10. Ann NYAcad Sci 1993; 685: 713-39.
32. Geissmann F, Revy P, Regnault A, et al. TGF- beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. J Immunol 1999; 162: 4567-75.
33. Chen W, Jin W, Hardegen N, et al. Conversion of peripheral $CD4^+$ CD25-naive T cells to CD4 + CD25 + regulatory T cells by TGF- beta induction of transcription factor Foxp3. J Exp Med 2003; 198: 1875-86.
34. Kulkarni AB, Becker D, Geiser A, et al. Transforming growth factor 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. Proc Natl Acad Sci 1993; 90: 770-4.
35. Sellheyer K, Bickenbach JR, Rothangel JA, et al. Inhibition of skin development by overexpression of transforming growth factor-β 1 in the epidermis of transgenic mice. Pro Natl Acad Sci 1993; 90: 5237-41.
36. Malkani AK, Baker BS, Garioch JJ, et al. Normal response to tumor necrosis factor- α and transforming growth factor-β by keratinocytes in psoriasis. Exp Dermatol 1993; 2: 224-30.
37. Gambichler T, Tomi NS, Skrygan M, et al. Alterations of TGF- beta/ Smad mRNA expression in atopic dermatitis following narrow-band ultraviolet B phototherapy: results of a pilot study. J Dermatol Sci 2006; 44: 56-8.
38. Nourani MR, Owada Y, Kitanaka N, et al. Localization of epidermal-type fatty acid binding protein in macrophages in advanced atretic follicles of adult mice. J Mol Histol 2005; 36: 391-400.

39. Qabar A, Nelson M, Guzman J, et al. Modulation of sulfur mustard induced cell death in human epidermal keratinocytes using IL-10 and TNF-alpha. J Biochem Mol Toxicol 2005; 19: 213-25.
40. Antoni M, Fyhrquist-Vanni N, Wolff H, et al. Transforming growth factor-b/Smad3 signalling regulates inflammatory responses in a murine model of contact hypersensitivity.Br J Dermatol 2008; 159: 546-54.
41. Anthoni M, Wang G, Deng Ch, et al. Smad3 signal transducer regulates skin inflammation and specific IgE Response in murine model of atopic dermatitis. J Invest Dermatol 2007; 127: 1923-9.
42. Koji S. TGF-B /Smad signaling inhibits IFN-gamma and TNF-alpha-induced TARC(CCL17) production in HaCa cells. J Dermatol Sci 2003; 31: 53-8.
43. Matsuura H, Myokai F, Arata J, et al. Expression of type II transforming growth factor-β receptor mRNA in human skin, as revealed by in situ hybridization. J Dermatol Sci 1994; 8: 25-32.
44. Schimid P, Cox D, Bilbe G, et al. TGF-βs and TGF-β type II receptor in human epidermis: Differential expression in acute and chronic skin wounds. J Pathol 1993; 171: 191-7.
45. Schmid P, Itin P, Cherry G, et al. Enhanced expression of transforming growth factor-β type I and type II receptors in wound granulation tissue and hypertrophic scar. Am J Pathol 1998; 152: 485-93.
46. Schmid P, Itin P, Rufil TH. In situ analysis of transforming growth factors-β (TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3) and TGF-β type II receptor expression in basal cell carcinomas. Br J Dermatol 1996; 134: 1044-51.
47. Sabourin CL, Danne MM, Buxton KL, et al. Cytokine, chemokine, and matrix metallo proteinase response after sulfur mustard injury to weanling pig skin. J Biochem Mol Toxicol 2002; 16: 263-72.
48. Kuo YR, Wu WS, Jeng SF, et al. Suppressed TGF-beta1 expression is correlated with up-regulation of matrix metalloproteinase-13 in keloid regression after flashlamp pulsed-dye laser treatment. Lasers Surg Med 2005; 36: 38-42.
49. Batova A, Danielpour D, Pirisi L , et al. Retinoic acid induces secretion of latent transforming growth factor β1 and β2 in normal and human papillomavirus type 16- immortalized human keratinocytes. Cell Growth Differ 1992; 3: 763-72.
50. Tong PS, Horowitz NN. Trans-retinoic acid enhances the growth response of epidermal keratinocytes to epidermal growth factor and transforming growth factor beta. J Invest Dermatol 1990; 94: 126-31.
51. Creek KE, Geslani G, Batova A. Progressive loss of sensitivity to growth control by retinoic acid and transforming growth factor-β at late stage of human papillomavirus type 16- initiated transformation of human keratinocytes. Adv Exp Med Biol 1995; 375: 117-35.
52. Koli K, Keski- Oja J. Vitamin D3 and calcipotriol enhance the secretion of transforming growth factor- beta 1 and beta 2 in cultured murine keratinocytes. Growth Factors 1993; 8: 153-63.
53. Lan CCE. FK506 independently upregulates transforming growth factor β and downregulates inducible nitric oxide synthase in cultured human keratinocytes: possible mechanisms of how tacrolimus ointment interacts with atopic skin. J Invest Dermatol 2000; 115: 3-11.
54. Reitamo S, Wollenberg A, Schopf E, et al. Safety and efficacy of 1 year of tacrolimus ointment monotherapy in adults with atopic dermatitis. Arch Dermatol 2000; 136: 999-1006.
55. Chatterjee S, Datta RN, Bahattacharuyya D, et al. Emollient and antipruritic effect of itch cream in dermatological disorders. Indian J Pharmacol 2005; 37:253-4.

TGF-β1 gene expression in skin lesions and correlation with pruritus in mustard gas exposed victims

Isa Khaheshi, MD[1,2]
Saeeid Keshavarz, MD[1]
Majid Shohrati, MD[1]
Abbasali Fooladi Imani, MD[1]
Mohammadreza Nourani, PhD[1]

1. Center for Research in Chemical Injuries, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran

Background and Aim: As a blistering agent, mustard gas causes a variety of disorders in different body organs, including the skin, such as altrations in DNA and clinical manifestations like pruritus. TGF-β1 molecule is a cytokine with anti-cell growth and inflammation suppression effects in skin inflammation. The aim of this study was to determine TGF-β1 gene exprtession in victims exposed to mustard gas and the correlation with the severity of their pruritus.

Methods: 17 victims exposed to mustard gas, 17 patients with chronic contact dermatitis and 10 healthy individuals were included in the study. The assessment of TGF-β1 expression in their skin samples was conducted by semi-quantitative RT-PCR followed by immunohistochemistry and classification of patients was done by pruritus severity scoring system (0-3).

Results: There was a significant decrease in TGF-β1 gene expression in mustard gas exposed victims comparing to chronic contact dermatitis group and the control group (P<0.05). In addition, in the absence of TGF-β1 expression, the severity of pruritus in the patient group significantly increased (P<0.05).

Conclusion: TGF-β1 has a significant role in chronic inflammatory skin lesions caused by mustard gas.

Keywords: TGF-β1, cytokine, mustard gas, pruritus

Received: Sep 18, 2010 Accepted: Nov 29, 2010

Dermatology and Cosmetic 2010; 1(4): 162-171

Corresponding Author
Mohammadreza Nourani, PhD

Mollasadra Ave, Baqiyatallah Hospital, Tehran, Iran.
Email: r.nourani@yahoo.com