

مقاله پژوهشی

بررسی تغییرات بیان miR-20a در مجروحین جنگی مواجه شده با گاز خردل

محدثه ولی‌زاده^۱، مسعود سلیمانی^{۲،۳}، شیوا ایرانی^۱، محمود تولایی^{۴*}

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه مهندسی بافت و علوم کاربردی سلولی دانشکده فناوری‌های پیشرفته در پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

تهران ایران

۳- گروه سلول‌درمانی و هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴- مرکز تحقیقات ژنتیک دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله تهران ایران علوم پزشکی تهران ایران

*مسئول مکاتبات: tavalla.mah@gmail.com

DOI: 10.22034/ascij.2022.1970969.1437

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۲۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۱۰

چکیده

سولفور موستارد یا گاز خردل یک عامل تاول‌زا می‌باشد که به عنوان سلاح جنگی مورد استفاده قرار گرفته است. جانبازان شیمیایی افرادی با آسیب‌های متعدد در اندام‌های مختلف به خصوص، پوست می‌باشند. مطالعات نشان داده است که عوارض گاز خردل در نتیجه آلکیلاسیون با DNA، RNA و پروتئین و لیپیدها می‌باشد که منجر به تغییرات متابولیکی و ژنتیکی می‌شود. دستگاه تنفس و پوست هدف اصلی آلکیلاسیون گاز خردل می‌باشند. microRNAها، RNAهای کوچک غیر کدگذار و تک رشته ای هستند که در تنظیم فضایی و مکانی سنتز پروتئین و پایداری RNAی پیام رسان نقش دارند. اختلال در بیان هر ژن miRNA برابر خواهد بود با اختلال در بیان چندین ژن کد کننده پروتئین که هر کدام می‌توانند نقشی اساسی در بیولوژی سلول ایفا نمایند. لذا هدف این مطالعه، بررسی تغییرات بیان microRNA miR-20a در پوست مصدومین شیمیایی می‌باشد. در این مطالعه در مجموع ۳۰ نمونه از بیوپسی پوست که شامل ۱۰ نمونه بیمار با SM متوسط، ۱۰ نمونه بیمار با SM شدید و ۱۰ نمونه کنترل جمع‌آوری شد. استخراج RNA و سنتز cDNA صورت گرفت. بررسی بیان ژن miR-20a با استفاده از روش Real-time PCR انجام شد. ژن 5s rRNA به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. جهت تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزار GraphPad Prism 6.07 استفاده شد. جهت بررسی ارزش بیومارکری ژن miR-20a از منحنی Roc استفاده شد. در این مطالعه با توجه به نتایج منحنی Roc ژن miR-20a در پوست دارای ارزش بیومارکری است اما نیاز به مطالعه بیشتری دارد.

کلمات کلیدی: miR-20a، بیان ژن، پوست، گاز خردل، بیومارکر، microRNA.

مقدمه

می‌تواند در محیط باقی بماند (۱، ۳، ۱۵). سولفور موستارد اولین بار در سال ۱۸۲۲ توسط Despretz ساخته شد و خاصیت تاول‌زایی آن در پوست حیوانات در سال ۱۸۸۶ توسط Meyer شرح داده شد.

گاز خردل، سولفورموستارد یا گاز تاول‌زا یک مایع روغنی با ترکیب کلر و گوگرد (دی کلرو اتیل سولفید) با بوی پیاز، یا سیر خردل است که در آب هوای معتدل ۱ تا ۲ روز و در مناطق سردسیر تا ماه‌ها

مابقی وارد جریان خون شده و علائم سیستمیک می‌دهد (۶، ۲۶).

اثرات سولفور موستارد روی پوست افراد مختلف قدری باهم تفاوت دارد و اثرات به مقدار ماده، مدت تماس با آن، نوع سولفور موستارد (گاز یا مایع)، درجه رطوبت پوست، ضخامت و سطح پوست، سالم بودن یا نبودن پوست و حرارت محیط بستگی دارد (۱۷).

حرارت بالای محیط، پوست مرطوب، گرم، نازک، آسیب دیده یا پوشیده با لباس ضایعات شدیدتری ایجاد می‌کند و زمان کوتاه‌تری برای بروز علائم نیاز دارد (۲۵).

آسیب حاد با سولفور موستارد چهار مرحله دارد: (۱) دوره‌ی نهفتگی، (۲) قرمزی، (۳) وزیکول و تاول، (۴) نکروز (۲۷).

امروزه به خوبی مشخص شده است که بهبود زخم توسط microRNAها تنظیم می‌شود (۱۸).

این RNAهای درون‌زای کوتاه ۲۱ نوکلئوتیدی غیرکدکننده، روی خود تا می‌شوند تا ساختار سنجاقل سر را تشکیل دهند (۵).

در جانوران miRNAها غالباً بعنوان رونوشت‌های اولیه چند سیستمی رونویسی می‌شوند که بعداً به چندین miRNA بالغ پردازش می‌گردند. سازمان‌دهی ژنومی این خوشه‌های miRNA غالباً به شدت محافظت شده است، یعنی در عملکرد و تنظیم هماهنگ نقش مهمی دارد. خوشه miR-17-92 یک مثال پروتوتایپی از یک ژن miRNA چند سیستمی است در ژنوم انسان. خوشه miR-17-92 شش miRNA را کد می‌کند که همراه هم در یک منطقه ۸۰۰ جفت بازی از کروموزوم ۱۳ انسان گروه‌بندی شده‌اند. توالی این miRNAهای بالغ و سازمان‌دهی آنها در همه مهره‌داران حفاظت شده است. خوشه miR-17-92 انسان در سومین اینترون یک رونوشت

در سال ۱۹۱۷ برای اولین بار در جنگ جهانی اول توسط آلمان به عنوان سلاح شیمیایی در شهر Ypre بلژیک به کار رفت و تعداد زیادی کشته و مجروح به جای گذاشت و در سال‌های بعد نیز توسط کشورهای دیگر در جنگ استفاده شد. در سال ۱۹۲۵ قانون منع به کارگیری عوامل سمی و خفه کننده در جنگ، در ژنو به تصویب رسید و بسیاری از کشورها از جمله عراق آن را امضا کردند ولی متأسفانه این معاهده به دست فراموشی سپرده شد و در سال ۱۳۶۱ (۱۹۸۳ میلادی) و در سال‌های بعد کشور عراق جهت جهت درهم شکستن مقاومت رزمندگان ایرانی و مردم شهرهای مختلف مانند خیبر، والفجر، فاو، جزایر مجنون و در حمله‌ی نظامی به شهر سردشت در سال ۱۳۶۶ از سولفور موستارد استفاده کرده و باعث کشته و مجروح شدن تعداد زیادی از هموطنان عزیزمان شد (۱۱، ۱۷، ۲۸).

این ماده یک آلکیل‌کننده‌ی قوی است که با اتصال به اجزا، پروتئین‌های سلولی و اسیدهای نوکلئیک منجر به نکروز سلولی می‌شود و مسبب عوارض فراوان در بافت پوست، چشم، دستگاه تنفسی، گوارش، سیستم آندوکراین، مغز استخوان، سیستم عصبی و سیستم ایمنی است و نیز آثار موتاژن و کارسینوژن دارد (۷، ۹).

بیشترین اثرات سمی سولفور موستارد روی پوست است و به علت خاصیت چربی دوست بودن آن به آسانی داخل اجزای لیپیدی بافت‌های در معرض تماس، نفوذ و تجمع پیدا می‌کند. در تماس با پوست ۸۰ درصد آن تبخیر و فقط ۲۰ درصد به وسیله پوست جذب می‌شود. در پوست نه تنها تجمع پیدا می‌کند بلکه از طریق پوست به بافت‌های دیگر بدن نیز انتشار می‌یابد. حدود ۱۰ تا ۱۲ درصد سولفور موستارد که به طور اولیه جذب شده در پوست باقی مانده و به ماکرومولکول‌های پوست متصل می‌شود و ۹۰ درصد

RNA توسط ابزار NanoDrop (ND-1000) اندازه‌گیری شد. کیفیت RNA توسط ژل الکتروفورز (اسپکتروفوتومتر Vis) ارزیابی شد. جهت سنتز cDNA، ۲۰ نانوگرم از RNA کل خالص شده توسط DNase I و از کیت Universal cDNA (Exiqon, Denmark) synthesis استفاده شد. سپس انکوبه کردن در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه و در نهایت انکوبه کردن در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه جهت غیرفعال کردن آنزیم RT انجام شد. مجموعه پرایمرهای LNA خاص شامل مخلوط پرایمرهای اختصاصی برای تقویت Real-time PCR miR-20a (Exiqon; product no 5s و no miR-20a: 203907) (Exiqon; product no 5s و no miR-20a: 203907) (MicroRNA™ LNA استفاده شد PCR primer set, Exiqon, Denmark) با استفاده از SYBR Green Master Mix (Takara, Japan) و دستگاه ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA) به شرح زیر انجام شد: ۹۵ درجه ۱۰ دقیقه (فعال‌سازی/ دناتوراسیون پلیمراز)، ۹۵ درجه ۱۰ ثانیه (دناتوراسیون)، ۶۰ درجه ۶۰ ثانیه تا ۴۵ سیکل (بازپخت و گسترش) کارایی جفت پرایمر توسط نرم‌افزار LinRegPCR (12.x) (AMC, Amsterdam, The Netherlands, <http://LinRegPCR.nl>) تعیین شد. سطح بیان ژن‌های کاندید با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد و با ژن مرجع 5s rRNA نرمالیزه شد. تمام آزمایش‌ها با سه تکرار انجام شد. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد (SD) ارائه شده و با استفاده از آزمون one-way ANOVA تجزیه و تحلیل شدند. منحنی‌های مشخصه عملکرد گیرنده (ROC) و سطح زیر منحنی ROC (AUC) برای تعیین حساسیت و

اولیه ۷ کیلو بازی قرار دارد که به C13 or f 25 معروف است. علی‌رغم حفاظت شدگی شدید توالی-های miRNA، توالی‌های اگزونی C13 or f 25 بین گونه‌ها چندان محدودیتی ندارند، یعنی تنها نقش این رونوشت تولید این miRNA می‌باشد. کلاستر miR-17-92 نه تنها در شکل‌گیری تومورها بلکه در تکوین طبیعی قلب، ریه و سیستم ایمنی موثر می‌باشد. کلاستر miR-17-92 شش miR شامل miR-17، miR-19a، miR-20a، miR-19b، miR-18a، miR-1-92 را کد می‌کند. بیان کلاستر miR-17-92 باعث تکثیر سلول، مهار آپاپتوز در سلول‌های سرطانی و هم چنین باعث القای آنژیوژنز می‌شود (۲۴). از این رو هدف ما بررسی سطح بیان نسبی miR-20a در نمونه‌های بیوپسی پوست جانبازی است که در معرض دو دوز مختلف SM قرار داشتند.

مواد و روش‌ها

نمونه بیوپسی پوست در مجموع ۳۰ نمونه شامل، ۱۰ نمونه پوست از جانباز در معرض SM با عوارض متوسط پوستی و ۱۰ نمونه پوست از جانباز در معرض SM با عوارض شدید پوستی بدون سابقه مواجهه با عوامل دیگر و ۱۰ نمونه کنترل تهیه شد (جدول ۱).

قبل از انجام مطالعه از کلیه افراد رضایت نامه کتبی و آگاهانه تایید شده توسط کمیته اخلاق (شماره IR.IAU.SRB.REC.1399.095) از دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات اخذ گردید.

نمونه بیماران از محل ضایعه فعال که به صورت پلاک اریتماتو و خارش‌دار و شامل دو رده اپیدرم و درم بود جمع‌آوری و در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. استخراج RNA کل با استفاده از معرف TRIZOL (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) طبق پروتکل سازنده استخراج شد. سپس غلظت

Graph Pad Software Inc., CA, and the 6.07
(USA انجام شد).

ویژگی miR انتخاب شده برای تشخیص بیماران در
معرض SM از گروه عادی استفاده شد. تمام تجزیه و
تحلیل‌های آماری با استفاده از Graph Pad Prism V.

جدول ۱ - مشخصات بالینی نمونه‌ها

نمونه	جنس/سن	تایپ
Normal volunteer	مرد/۵۵	N1
Normal volunteer	مرد/۵۸	N2
Normal volunteer	مرد/۵۹	N3
Normal volunteer	مرد/۵۹	N4
Normal volunteer	مرد/۵۶	N5
Normal volunteer	مرد/۵۹	N6
Normal volunteer	مرد/۵۹	N7
Normal volunteer	مرد/۴۷	N8
Normal volunteer	مرد/۵۱	N9
Normal volunteer	مرد/۶۰	N10
Moderately-exposed patient	مرد/۵۶	C1
Moderately-exposed patient	مرد/۵۷	C2
Moderately-exposed patient	مرد/۵۶	C3
Moderately-exposed patient	مرد/۵۸	C4
Moderately-exposed patient	مرد/۶۳	C5
Moderately-exposed patient	مرد/۵۷	C6
Moderately-exposed patient	مرد/۶۲	C7
Moderately-exposed patient	مرد/۵۷	C8
Moderately-exposed patient	مرد/۶۰	C9
Moderately-exposed patient	مرد/۵۸	C10
Highly-exposed patient	مرد/۵۹	C11
Highly-exposed patient	مرد/۵۹	C12
Highly-exposed patient	مرد/۵۷	C13
Highly-exposed patient	مرد/۶۳	C14
Highly-exposed patient	مرد/۵۶	C15
Highly-exposed patient	مرد/۶۱	C16
Highly-exposed patient	مرد/۶۱	C17
Highly-exposed patient	مرد/۶۵	C18
Highly-exposed patient	مرد/۶۱	C19
Highly-exposed patient	مرد/۵۸	C20

نتایج

patient در مقایسه با نمونه‌های پوست کنترل اختلاف معنادار از نظر آماری وجود داشت ($P_{\text{value}} < 0/0001$) به عبارتی کاهش بیان در highly SM miR-20a و moderately SM miR-20a در مقایسه با نمونه کنترل مشاهده شد (شکل ۳).

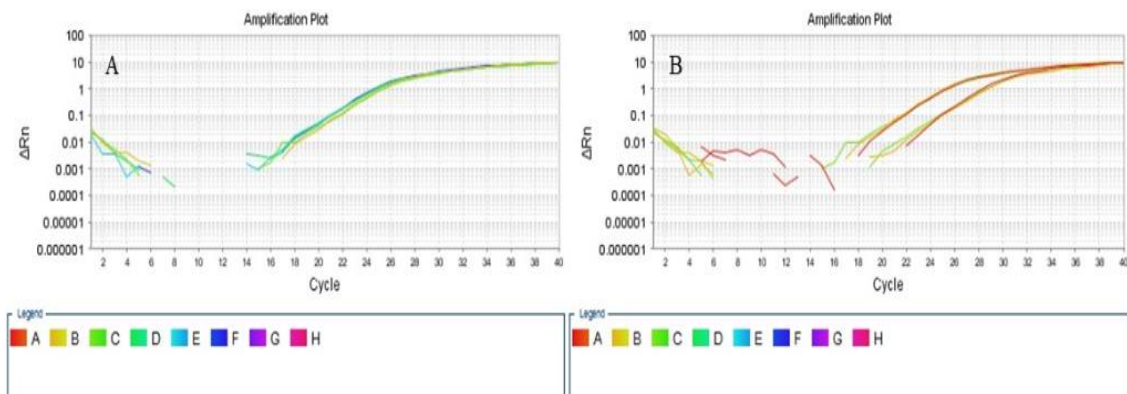
جهت ارزیابی ارزش بیومارکری به تجزیه و تحلیل منحنی Receiver operating characteristic (Roc) در دو گروه افراد بیمار با عوارض شدید و متوسط و نمونه کنترل پرداخته شد (شکل ۴).

سطح زیر منحنی (Area) که نشانگر دقت در تمایز بافت بیماران و نمونه کنترل است و اختصاصیت و حساسیت در miR-20a برابر است با: highly exposed miR-20a (حساسیت: ۱، اختصاصیت: ۰/۷، سطح زیر منحنی: ۰/۷۰، $p = 0/13$)، Moderately exposed miR-20a (حساسیت: ۱، اختصاصیت: ۰/۷، سطح زیر منحنی: ۰/۷۸، $p = 0/034$).

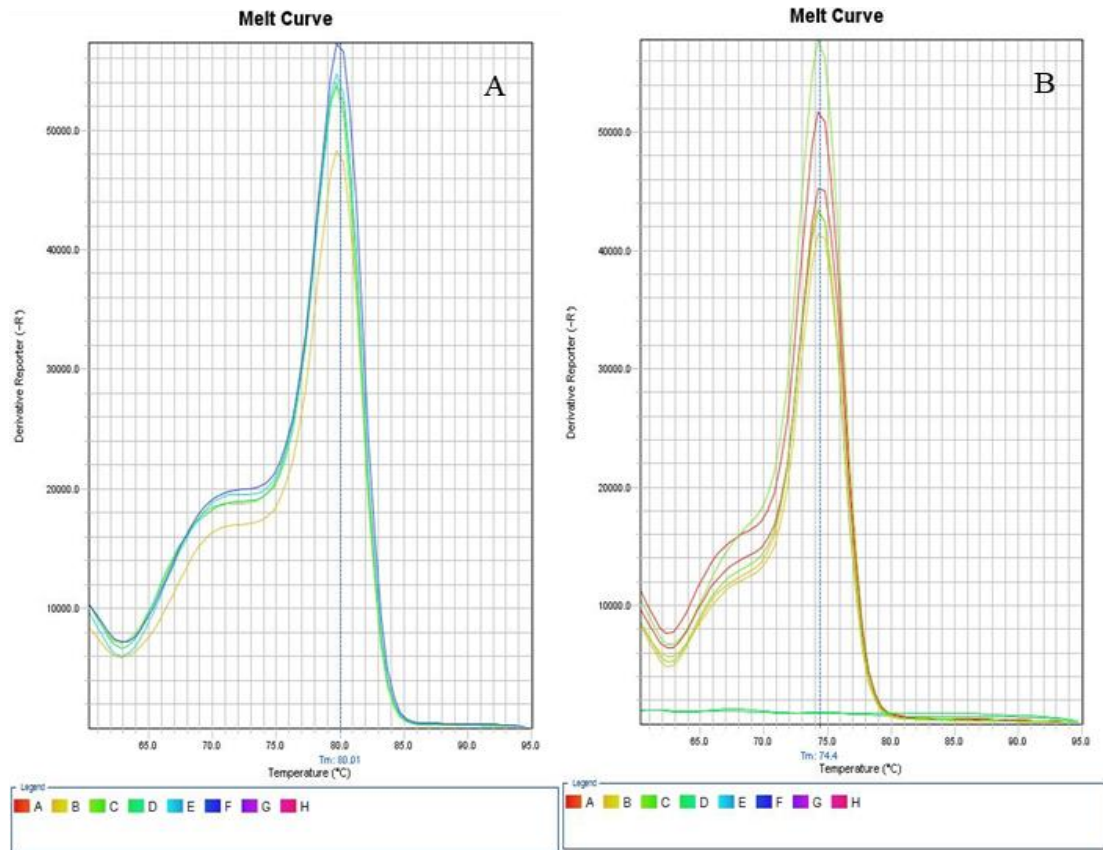
با توجه به استفاده از رنگ فلورسانس در این تحقیق، جهت تایید بر اتصال صحیح پرایمرها، اطمینان از تکثیر قطعه‌های اختصاصی و بررسی، نبود قطعه‌های غیراختصاصی و دایمر پرایمر در محصول PCR توسط دستگاه StepOnePlus™ Real-Time PCR System منحنی تکثیر و ذوب رسم گردید (شکل ۱ و ۲).

در این مطالعه با توجه به مشخصات بالینی بیماران در معرض SM و افراد سالم و بهینه‌سازی miR-20a و 5s rRNA تست Real-Time PCR رسم گردید و مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. نتایج بیان miR-20a در نمونه‌های جانبازان moderately SM و highly SM با افراد نرمال با استفاده از آزمون one-way ANOVA در نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه 6.07 مورد بررسی قرار گرفت.

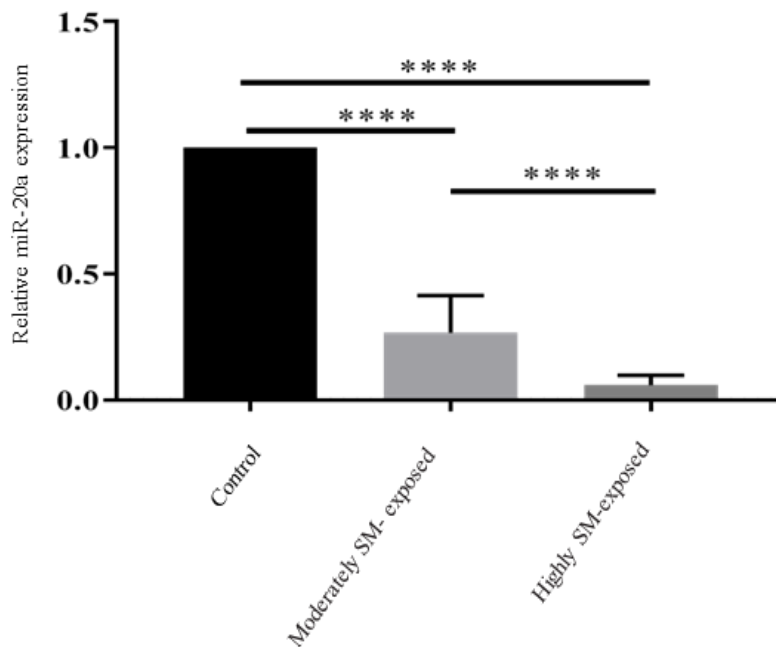
در مقایسه آنالیز نتایج بدست آمده از آزمایش کمی میزان بیان miR-20a در نمونه‌های پوست highly SM-exposed patient و moderately SM-exposed



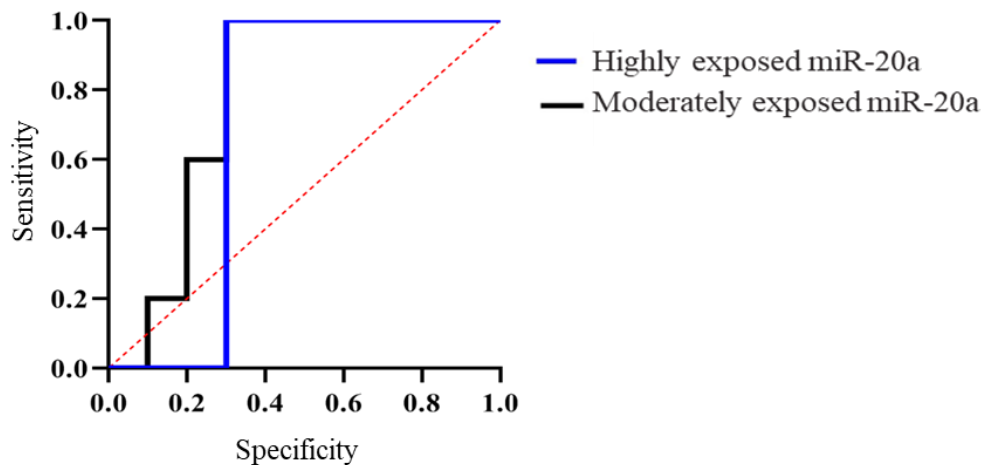
شکل ۱- تصویر منحنی تکثیر miR-20a (A) و 5s rRNA (B) در نمونه بافت پوست مصدومان شیمیایی و بافت کنترل



شکل ۲- تصویر منحنی ذوب (A) miR-20a، (B) 5s rRNA در نمونه بافت پوست مصدومان شیمیایی و بافت کنترل



شکل ۳- بررسی بیان miR-20a در نمونه بافت پوست مصدومان شیمیایی (Moderately exposed و highly exposed) و بافت کنترل. p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد و با * نشان داده شد. ** نشان دهنده $p < ۰/۰۱$ ، *** نشان دهنده $p < ۰/۰۰۱$ و **** نشانگر $p < ۰/۰۰۰۱$ است.



شکل ۴- بررسی منحنی ROC در بیماران مبتلا به highly SM و moderately SM و نمونه کنترل.

بحث

اگر چه هنوز ابهاماتی در پاتوفیزیولوژی مکانیسم ایجادکننده‌ی عوارض دیررس ناشی از گاز خردل وجود دارد، اما نقش عوامل التهابی مزمن، تغییرات سایتوکاین‌ها و رادیکال‌های آزاد و اثرات مخرب بر آنزیم‌ها و میتوکندری سلول‌ها و متوقف کردن تکثیر DNA در هسته سلولی مطرح شده است (۷، ۱۲).

آلوانگ و همکارانش در سال ۲۰۱۵ طی تحقیقات خود تنظیم پایین miR-20a-5p و miR-92 در بیماران در معرض SM در طول فاز مزمن بیماری ناشی از آن را گزارش داده‌اند (۲).

در سال‌های ۲۰۱۷ و ۲۰۱۸ وی و همکارانش و لیو به همراه همکارانش طی تحقیقات خود اعلام کردند miR-20a به عنوان عضوی از خوشه miR-17-92، دارای عملکرد خاص بافت و سلول با اثرات مختلف بر التهاب مشابه miR-21 است. آنها نشان دادند که miR-20a با کاهش بیان ژن‌های پروفیبروتیک و افزایش سطح ژن ضدفیبروتیک، فرآیندهای فیبروتیک را مهار می‌کند (۲۳، ۲۹).

بنابراین miR-20a-5p عمدتاً به عنوان یک عامل ضد فیبروتیک در نظر گرفته می‌شود. به دلیل وجود

سولفور موستارد یک ماده‌ی الکیله‌کننده‌ی قوی با خواص سیتوتوکسیک و موتاژنیک و تاول‌زا می‌باشد که با تمام ترکیبات پوست مانند DNA، RNA، پروتئین و غیره می‌تواند واکنش نشان دهد (۱۸، ۱۹).

اثرات بالینی اولیه بعد از تماس به صورت اریتم، خارش، سوزش و سوختگی پوست، احساس خارش و جسم خارجی در چشم، اشک ریزش، ترس از نور، تورم پلک، احتقان و پر خونی ملتحمه، آسیب و زخم قرنیه است. اثرات تنفسی به صورت آب ریزش از بینی، سرفه، التهاب مجاری هوایی و اختلال تنفس می‌باشد (۸، ۱۴، ۱۶).

سندرم دیسترس حاد تنفسی و برونکوپنومنی علت عمده‌ی مرگ و میر در مجروحین جنگی بود (۴، ۱۵، ۱۶).

به جز عوارض حاد که در اولین ساعات بعد از تماس با این گاز، به دلیل التهاب و تخریب سلول‌ها ظاهر می‌شود، در گروه عمده‌ای از جانبازان و افراد غیر نظامی تماس یافته، عوارض پایدار، غیرقابل برگشت (۸، ۱۴، ۱۶، ۲۰) و دیر ظهور متعددی گزارش شده است که چند ماه تا چند سال پس از تماس ایجاد می‌شود (۱۳).

تشکر و قدردانی

این کار با حمایت مالی و معنوی، پارک علم و فناوری دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. نویسندگان هیچ تضاد منافی را اعلام نمی‌کنند.

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. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 287(6):1160-1164.
2. Alvanegh A.G., Edalat H., Fallah P., Tavallaei M. 2015. Decreased expression of miR-20a-5p and miR-92a in the serum from sulfur mustard-exposed patients during the chronic phase of resulting illness. *Inhalation Toxicology*, 27(13):682-688.
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. *Clinical and Experimental Allergy*, 33(5):595-599.
4. Azizi F. 2001. The effect of chemical weaponry on endocrine system. *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 3(3):211-222.
5. Bartel D.P. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2):215-233.
6. Chilcott R.P., Jenner J., Carrick W., Hotchkiss S.A.M., Rice P. 2000. Human skin absorption of bis-2-(chloroethyl) sulphide (sulphur mustard) in vitro. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, 20(5):349-355.
7. Davoudi S.M., Shohrati M., Sadr S.B. 2006. Prevalence of skin tumors in veterans from 17 screened provinces of Iran and compared with the normal population. *Annals of Military and Health Sciences Research*, 4:751-754.

ژن‌های هدف متفاوت miR-20a، پاسخ‌های التهابی متنوعی در انواع مختلف سلول رخ می‌دهد (۲۳).
miR-20a-5p با سرکوب التهاب NLRP3، مهار تولید و ترشح سیتوکین‌های التهابی مانند IL1 و سرکوب تمایز مونوسیت‌ها به ماکروفاژها به عنوان یک عامل ضد التهابی عمل می‌کند (۲۱، ۲۲، ۲۹).

ژو و همکارانش در سال ۲۰۱۳ اعلام کردند، miR-20a-5p با مهار پروتئین تنظیم کننده سیگنال (SIRP) α ، که تنظیم کننده منفی فعالیت ماکروفاژهای آلوئولی است، پاسخ‌های التهابی ماکروفاژها را ارتقا می‌دهد (۳۰).

با توجه به مکانیسم‌های پاتوفیزیولوژیک زمینه‌ای نامشخص SM، درک اساس مولکولی التهاب و فیبروز در جانبازان در معرض SM مفید است. ما کاهش تنظیم رونوشت miR-20a-5p را در نمونه‌های پوست در معرض SM یافتیم. با توجه به نتایج مطالعه حاضر، بیان نسبی miR-20a-5p در بیماران بسیار در معرض کمتر از گروه با مواجهه متوسط است. این تنظیم پایین دلالت بر آسیب وابسته به دوز SM دارد (۱۲).

نتیجه‌گیری

داده‌های ما تنظیم پایین miR-20a-5p را در نمونه‌های بیوپسی پوست بیماران در معرض SM نشان داد. تنظیم پایین این microRNA در پوست جانبازان در معرض SM، التهاب، فیبروز و سایر تظاهرات علائم سمیت SM را توضیح می‌دهد. ما همچنین نشان دادیم که بیان نسبی miR-20a-5p می‌تواند نشانگر زیستی بالقوه‌ای در تشخیص بیماران در معرض SM از افراد سالم باشد. بنابراین، استفاده از microRNA ها به عنوان درمان‌های نسل جدید می‌تواند به کاهش عوارض مزمن مسمومیت SM کمک کند.

- and cancer in Iranian soldiers of imposed war in Isfahan Province: A Pilot Study. *Journal of School of Public Health and Institute of Public Health Research*, 4(3):15-23.
16. Karimi Z.A., Holakouei N.K. 2003. Long-term pulmonary complications in combatants exposed to sulfur mustard: A historical cohort study. *Journal of School of Public Health and Institute of Public Health Research*, 1(4):15-22.
17. Kehe K., Szinicz L. 2005. Medical aspects of sulphur mustard poisoning. *Toxicology*, 214(3):198-209.
18. Kehe K., Thiermann H. 2009. Clinical picture of sulfur mustard poisoning. *Toxicology*, 263(1):1-74.
19. Kehe K., Balszuweit F., Steinritz D., Thiermann H. 2009. Molecular toxicology of sulfur mustard-induced cutaneous inflammation and blistering. *Toxicology*, 263(1):12-19.
20. Kh A., Ghasemi Broumand M. 2004. Epidemiological relationship with late complications of sulfur mustard gas on 500 Iranian chemically injured after 15 years. *Journal of Army University Medical Sciences of IR*, 2(1):269-273.
21. Li X.F., Shen W.W., Sun Y.Y., Li W.X., Sun Z.H., Liu Y.H., Zhang L., Huang C., Meng X.M., Li J. 2016. MicroRNA-20a negatively regulates expression of NLRP3-inflammasome by targeting TXNIP in adjuvant-induced arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Joint Bone Spine*, 83(6):695-700.
22. Liang B., Wang X., Song X., Bai R., Yang H., Yang Z., Xiao C., Bian Y. 2017. MicroRNA-20a/b regulates cholesterol efflux through post-transcriptional repression of ATP-binding cassette transporter A1. *Biochimica et biophysica acta Molecular and cell biology of lipids*. 1862(9):929-938.
23. Liu Z., Yu H., Guo Q. 2018. MicroRNA-20a promotes inflammation via
8. Ebadi A. 2008. Coping resource in chemical victims with mustard gas: A qualitative study. *International Journal of Behavioral Sciences*, 2(2):107-116.
9. Emadi N., Soroush M., Moinoldin F., Davoudi S.M., Jalalian H., Khodaie Ardakani M. 2007. Atrophy and poikiloderma after skin contact with mustard gas: a case report. *Iranian Journal of Dermatology*, 10(42):345-352.
10. Etezzad-Razavi M., Hefazi M., Mahmoudi M., Balali-Mood M. 2006. Correlation of delayed mustard gas ocular complications with severity of skin, respiratory, hematologic, and immunologic complications. *Bina Journal of Ophthalmology*, 11(2):213-221.
11. Feister A.J., Robinson S.I., Papirmeister B. 1991. Medical defense against mustard gas: toxic mechanisms and pharmacological implications. Boca Raton Fla, CRC Press, 359 p.
12. Gao X., Ray R., Xiao Y., Barker P.E., Ray P. 2007. Inhibition of sulfur mustard-induced cytotoxicity and inflammation by the macrolide antibiotic roxithromycin in human respiratory epithelial cells. *BMC Cell Biology*, 8(1):1-9.
13. Ghasemi B.M., Karami G.R., Pourfarzam S.H., Emadi S., Ghasemi H. 2007. Late concurrent ophthalmic, respiratory, coetaneous and psychiatric complications of chemical weapons exposure in 479 war patients. *Daneshvar Medicine*, 70(4):81-92.
14. Ghazanfari T., Yaraee R.O.Y.A., KiaSalari Z., Hedayati F., Ghasemi H., PourFarzam S., Soroush M.R., Faghihzadeh S. 2009. Evaluation of serum levels of nitric oxide in chemical victims of Sardsh 20 years after sulfure mustard exposure. *Iranian Journal of War and Public Health*, 1(2):9-23.
15. Gilasi H.R., Holakouie Naieni K., Zafarghandi M.R., Mahmoudi M., Ghanei M., Soroush M.R., Dowlatyari A., Ardalan A. 2006. Relationship between mustard gas

lewisite. *Washington: National Academy Press*.148-75.

28. Wattana M. and Bey T. 2009. Mustard gas or sulfur mustard: an old chemical agent as a new terrorist threat. *Prehospital and Disaster Medicine*, 24(1):19-29.

29. Wei L., Ran F. 2018. MicroRNA-20a promotes proliferation and invasion by directly targeting early growth response 2 in non-small cell lung carcinoma. *Oncology Letters*, 15(1):271-277.

30. Zhu D., Pan C., Li L., Bian Z., Lv Z., Shi L., Zhang J. Li D., Gu H., Zhang C.Y., Liu Y. 2013. MicroRNA-17/20a/106a modulate macrophage inflammatory responses through targeting signal-regulatory protein α . *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132(2):426-436.

the nuclear factor- κ B signaling pathway in pediatric pneumonia. *Molecular Medicine Reports*, 17(1):612-617.

24. Mendell J.T. 2008. miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. *Cell*, 133(2):217-222.

25. Nagy S.M., Golumbic C., Stein W.H., Fruton J.S., Bergmann M. 1946. The penetration of vesicant vapors into human skin. *The Journal of General Physiology*, 29(6): 441-469.

26. Paromov V. Suntres Z. Smith M. and Stone W.L. 2007. Sulfur mustard toxicity following dermal exposure: role of oxidative stress, and antioxidant therapy. *Journal of Burns and Wounds*, 7.

27. Pechura C.M., Rall D.P. 1993. Veterans at risk, the health effects of mustard gas and

Evaluation of Changes in miR-20a Expression Changes in War Wounded Exposed to Mustard Gas

Mohadeseh Valizadeh¹, Masoud Soleimani^{2,3}, Shiva Irani¹,
Mahmoud Tavallaei^{4*}

1- Department of Biology, Research Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Department of Tissue Engineering and Cellular Applied Sciences, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3-Department of Cell Therapy and Hematology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Genetic Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Sulfur mustard or mustard gas is a blistering agent that has been used as a war weapon. Chemical veterans are people who have multiple injuries in different organs, especially in the skin. Studies have shown that the side effects of mustard gas are the result of alkylation with DNA, RNA, protein, and lipids, which leads to metabolic and genetic changes. The respiratory system and the skin are the main targets of mustard gas alkylation. microRNAs are small non-coding and single-stranded RNAs that play a role in the spatial and spatial regulation of protein synthesis and the stability of messenger RNA. The disruption of the expression of any miRNA gene will be equal to the disruption of the expression of several protein-coding genes, each of which can play an essential role in cell biology, so to investigate the changes in the expression of microRNA, miR-20a, in the skin of chemically injured people. In this study, 30 skin biopsy samples were collected, including 10 samples from patients with moderate SM, 10 samples from patients with severe SM, and 10 control samples. RNA extraction and cDNA synthesis were performed. The expression of the miR-20a gene was investigated using the Real-time PCR method. 5s rRNA gene was used as the internal control. GraphPad Prism 6.07 software was used for the statistical analysis of data. Roc curve was used to check the biomarker value of the miR-20a gene. In this study, according to the results of the Roc curve, the miR-20a gene in the skin has a biomarker value, but it needs more study.

Keywords: miR-20a, Gene expression, Skin, Mustard Gas, Biomarker, MicroRNA.

