

مقاله پژوهشی

بررسی تغییرات بیان miR-21 در نمونه پوست جانبازان در معرض گاز خردل جنگ عراق در ایران

محدثه ولی‌زاده^۱، مسعود سلیمانی^{۲*}، شیوا ایرانی^۱، محمدرضا نورانی^۳، 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-

گروه سلول درمانی و هماتولوژی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران ایران

۳- مرکز تحقیقات نانو بیوتکنولوژی دانشگاه بقیه الله تهران، ایران

۴- مرکز تحقیقات ژنتیک دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله تهران ایران علوم پزشکی تهران ایران

*مسئول مکاتبات: Soleim_m@modares.ac.ir

DOI: 10.22034/ascij.2022.1953387.1369

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۰۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۰۷

چکیده

سولفور موستارد یا گاز خردل (SM) یک عامل تاول‌زا است و دارای اثرات مخربی بر روی ریه، چشم‌ها و پوست می‌باشد. microRNAها مولکول‌های RNA غیرکدکننده‌ای هستند که بسیاری از مسیرهای مهم سلولی را تنظیم می‌نمایند. ارتباط مشخص تغییرات بیانی microRNAها در طیف وسیعی از بیماری‌ها و رهگیری آنها در اندام‌های مختلف بدن از جمله در پوست آنها را به بیومارکر مناسبی تبدیل نموده است. هدف این مطالعه بررسی تغییرات بیان ژن miR-21 در جانبازان شیمیایی آلوده با SM می‌باشد. در این مطالعه نمونه‌های بیوپسی پوست شامل ۱۰ فرد جانباز در معرض SM با عوارض متوسط، ۱۰ فرد جانباز در معرض SM با عوارض شدید و ۱۰ نمونه کنترل جمع‌آوری و سپس RNA تام استخراج شد. سنتز cDNA صورت گرفت. بررسی بیان ژن miR-21 با استفاده از روش Real-time PCR انجام شد. از ژن 5s rRNA به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه 6.07 جهت تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها استفاده شد. منحنی Roc جهت بررسی ارزش بیومارکری ژن miR-21 استفاده شد. افزایش بیان ژن miR-21 در نمونه‌های جانبازان در معرض SM نسبت به نمونه نرمال مشاهده شد. بیان ژن miR-21 در نمونه‌های پوست جانبازان در معرض SM با عوارض متوسط و جانبازان در معرض SM با عوارض شدید در مقایسه با نمونه‌های پوست کنترل اختلاف معنادار از نظر آماری وجود داشت ($p < 0.0001$). بیان ژن miR-21 در نمونه‌های پوست جانبازان در معرض SM با عوارض شدید و جانبازان در معرض SM با عوارض متوسط در سن با نمونه کنترل ارتباط معناداری مشاهده نشد ($p = 0.3802$, $p = 0.8049$). در این مطالعه ما نشان دادیم که بیان نسبی miR-21 می‌تواند نشانگر زیستی بالقوه‌ای در تشخیص جانبازان در معرض SM از افراد سالم باشد اما نیاز به مطالعه بیشتری دارد.

کلمات کلیدی: بیان ژن، miR-21، پوست، سولفور موستارد، بیومارکر.

مقدمه

دهند. پارگی این تاول‌ها منجر به تشکیل یک لایه نکروزه و یک اسکار می‌شود (۱۹، ۳۷).

بهبود زخم به دنبال آسیب ناشی از SM طولانی است و بازسازی بافت می‌تواند منجر به ایجاد رنگدانه و تشکیل اسکار شود که با عوارض متوسط پوستی عنوان می‌شود (patient moderately SM-exposed) (۳۳، ۳۴). مکانیسم‌های زمینه ساز آسیب پوستی ناشی از SM به خوبی شناخته نشده است (۴۹).

SM به عنوان یک عامل آلکیله‌کننده دو عملکردی، بسیاری از اهداف را در بافت‌ها از جمله DNA، پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه و آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند گلوکاتایون و تیوردوکسین تغییر می‌دهد (۳۰، ۳۱). این اختلال ترمیم زخم یک مشکل عمده در درمان جانبازان در معرض SM با عوارض شدید پوستی (highly SM-exposed patient) است، برخلاف مکانیسم سمی آلکیله کردن، علت اختلال در ترمیم زخم به خوبی شناخته نشده است (۴۴). امروزه به خوبی مشخص شده است که بهبود زخم توسط microRNA ها تنظیم می‌شود (۲۷). این RNA های درون‌زای کوتاه ۲۱ نوکلئوتیدی غیرکدکننده، روی خود تا می‌شوند تا ساختار سنجاق سر را تشکیل دهند (۲، ۲۲).

miR-21 یکی از miRNA هایی است که اغلب در تومورها بیان می‌شود. سطوح بالای آن برای اولین بار در لنفوم‌های سلول B توصیف شد. به طور کلی، miR-21 یک "onco-miR" معمولی در نظر گرفته می‌شود که با مهار بیان فسفاتازها، که فعالیت مسیرهای سیگنالینگ مانند AKT و MAPK را محدود می‌کند، عمل می‌کند. از آنجایی که اکثر اهداف miR-21 سرکوبگرهای تومور هستند، miR-21 با انواع مختلفی از سرطان‌ها از جمله سرطان پستان (۱۴)، تخمدان‌ها (۱۵)، دهانه رحم (۲۵)، روده بزرگ (۱)، کبد (۲۹)، مغز (۳)، مری (۱۳)، پروستات، پانکراس، ریه (۴۷) و

سولفور خردل (SM, bis 2-chloroethyl sulfide) یک قارچ کش پوستی می‌باشد که در جنگ‌های شیمیایی (۶، ۱۶، ۲۴، ۴۸). چون جنگ جهانی اول (۱۹۱۴-۱۹۱۸) و جنگ ۸ ساله عراق و ایران (۱۹۸۰-۱۹۸۸) مورد استفاده قرار گرفته است (۲۱). از زمان اولین استفاده گسترده از سلاح‌های شیمیایی که در طول جنگ جهانی اول بود، آنها تهدیدی برای سربازان و غیرنظامیان به شمار می‌روند (۳۶، ۳۸). در طول جنگ ۸ ساله عراق و ایران حدود ۱۰۰۰۰۰ نفر از مردم نظامی و غیرنظامی ایران در معرض SM قرار گرفته بودند و گروه بزرگی متشکل از ۳۴۰۰۰ نفر تا کنون از اثرات مزمن آن رنج می‌برند (۲۱). شدت و میزان آسیب در بازمانده‌های در معرض SM به عوامل مختلفی مانند کمیت، طول و مدت قرار گرفتن در معرض عامل و سایر عوامل شیمیایی، سن و جنس، وضعیت تغذیه و سلامت بستگی دارد. برخی از این عوامل با فراوانی صدمات، علائم اولیه، مصرف داروها و طول مدت بستری در بیمارستان ارتباط دارند. اثرات موضعی حاد مواجهه به دلیل تماس با غلظت‌های نسبتاً بالای عامل است که بیشتر به صورت ضایعات پوستی، چشمی و تنفسی ظاهر می‌شود (۹، ۱۷).

SM یک عامل قلیایی قوی است که از طریق اتصال به اجزای پروتئین سلولی و اسیدهای نوکلئیک منجر به نکروز سلولی می‌شود و در نتیجه عوارضی ایجاد می‌کند که می‌تواند عواقب جهش‌زا و سرطان‌زا را ایجاد کند (۴، ۱۱، ۵۲). شدت آسیب پوستی ناشی از SM تحت تأثیر دوز و زمان قرار گرفتن در معرض و همچنین مکان روی پوست است (۱۱، ۴۱).

سمیت پوستی معمول در انسان ناشی از قرار گرفتن در معرض SM شامل شروع با التهاب است (۴۳).

به دنبال آن وزیکول‌های پر از مایع تشکیل می‌شوند که می‌توانند با هم ترکیب شوند و تاول‌های آویزانی را تشکیل

Denmark) 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-21 (Exiqon; product no 204230) و miR-21: 204230 (Exiqon; product no 203906) استفاده شد (MicroRNA™ LNA PCR primer set, Exiqon, Denmark).

Real-time PCR: با استفاده از SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) و دستگاه (Takara, Japan) ABI 7500 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. 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 T-Test تجزیه و تحلیل شدند. منحنی‌های مشخصه عملکرد گیرنده (ROC) و سطح زیر منحنی ROC (AUC) برای تعیین حساسیت و ویژگی miR انتخاب شده برای تشخیص بیماران در معرض SM از گروه عادی استفاده شد.

آنالیز آماری: P-Value کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد و با * نشان داده شد. ** نشان دهنده $p < 0/01$ و *** نشان دهنده $p < 0/001$ و **** نشانگر $p < 0/0001$ است. تمام تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از Graph Pad Software Inc., CA, Pad Prism V. 6.07 and the USA انجام شد.

تیروئید (۴۵) مرتبط است. به جهت عدم درمان ضایعات پوستی برای جانبازان در معرض SM، از گزینه‌های درمانی موجود چون عوامل ضد التهابی رایج، برای کاهش علائم بالینی استفاده می‌شود (۷، ۲۶، ۲۸).

جهت یافتن درمان جدید برای جانبازان در معرض SM ارزیابی اساس مولکولی اثرات نامطلوب SM، می‌تواند کمک کننده باشد. از این جهت، هدف ما ارزیابی سطح بیان نسبی miR-21، در نمونه‌های بیوپسی پوست جانبازانی است که در معرض دوزهای مختلف SM قرار داشتند.

مواد و روش‌ها

جامعه مورد مطالعه: نمونه بیوپسی پوست از ۱۰ جانباز در معرض SM با عوارض متوسط پوستی (-moderately SM-patient exposed)، ۱۰ جانباز در معرض SM با عوارض شدید پوستی (highly SM-exposed patient) 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 خارش دار و شامل دو رده اپیدرم و درم بود جمع‌آوری و در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

استخراج RNA و Real-time PCR: استخراج RNA کل با استفاده از معرف TRIZOL (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) طبق پروتکل سازنده استخراج شد. سپس غلظت RNA توسط ابزار NanoDrop (ND-1000) اندازه‌گیری شد. کیفیت RNA توسط ژل الکتروفورز (اسپکتروفتومتر Vis) ارزیابی شد. جهت سنتز cDNA، ۲۰ نانوگرم از RNA کل خالص شده توسط DNase I و از کیت Universal cDNA synthesis Kit (Exiqon،

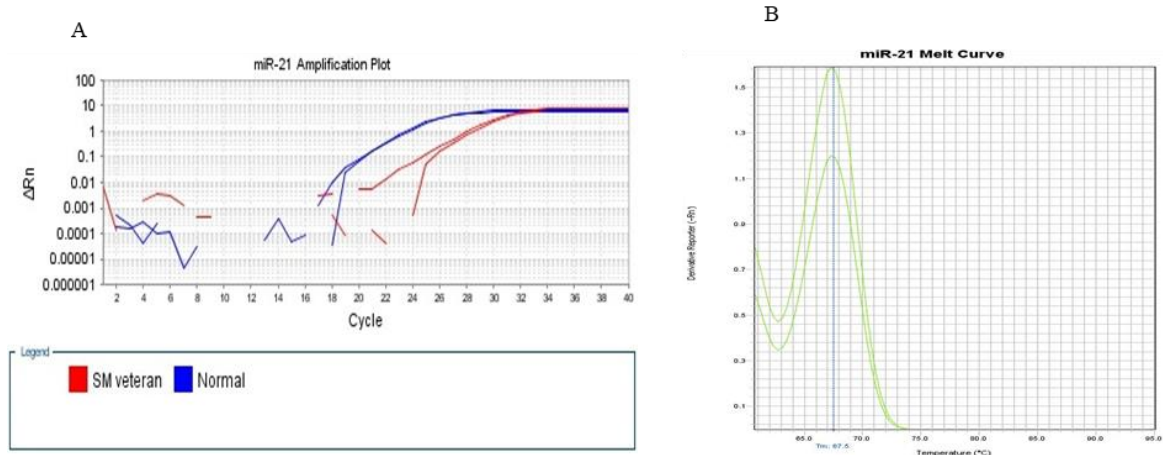
جدول ۱- مشخصات بالینی نمونه‌ها

نمونه	سن/جنسیت	تایپ	نمونه	سن/جنسیت	تایپ	نمونه	سن/جنسیت	تایپ
N1	۶۰/مرد	Normal volunteer	C1	۴۲/مرد	moderately SM-exposed patient	C11	۳۹/مرد	highly SM-exposed patient
N2	۳۷/مرد	Normal volunteer	C2	۵۷/مرد	moderately SM-exposed patient	C12	۴۹/مرد	highly SM-exposed patient
N3	۳۸/مرد	Normal volunteer	C3	۴۶/مرد	moderately SM-exposed patient	C13	۴۷/مرد	highly SM-exposed patient
N4	۴۹/مرد	Normal volunteer	C4	۵۸/مرد	moderately SM-exposed patient	C14	۳۹/مرد	highly SM-exposed patient
N5	۴۴/مرد	Normal volunteer	C5	۴۳/مرد	moderately SM-exposed patient	C15	۵۶/مرد	highly SM-exposed patient
N6	۴۹/مرد	Normal volunteer	C6	۵۷/مرد	moderately SM-exposed patient	C16	۴۱/مرد	highly SM-exposed patient
N7	۴۹/مرد	Normal volunteer	C7	۴۲/مرد	moderately SM-exposed patient	C17	۳۱/مرد	highly SM-exposed patient
N8	۶۰/مرد	Normal volunteer	C8	۴۷/مرد	moderately SM-exposed patient	C18	۳۵/مرد	highly SM-exposed patient
N9	۶۳/مرد	Normal volunteer	C9	۴۰/مرد	moderately SM-exposed patient	C19	۴۱/مرد	highly SM-exposed patient
N10	۴۹/مرد	Normal volunteer	C10	۴۸/مرد	moderately SM-exposed patient	C20	۵۸/مرد	highly SM-exposed patient

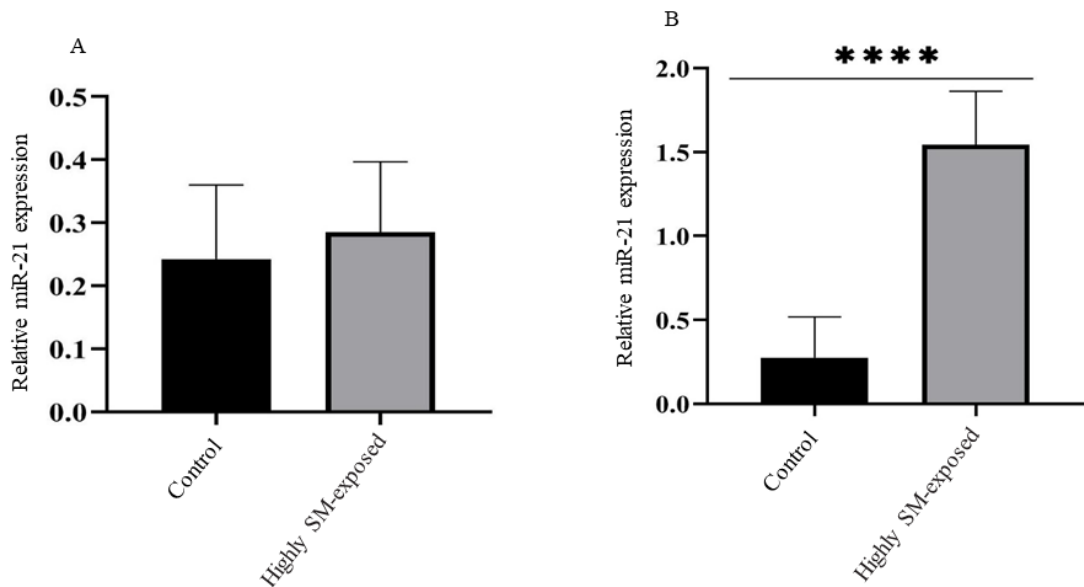
نتایج

اما در مقایسه آنالیز نتایج بدست آمده از آزمایش کمی میزان بیان miR-21 در نمونه های پوست highly SM-exposed patient و moderately SM-exposed patient در مقایسه با نمونه های پوست کنترل اختلاف معنادار از نظر آماری وجود داشت ($p < 0/0001$) به عبارتی افزایش بیان در highly SM miR-21 و moderately SM miR-21 در مقایسه با نمونه کنترل مشاهده شد (شکل ۲B و ۳B). جهت ارزیابی ارزش بیومارکری به تجزیه و تحلیل منحنی (Roc) Receiver operating characteristic در دو گروه افراد بیمار (highly SM miR-21 و moderately SM miR-21) و نمونه کنترل پرداخته شد (شکل ۴. A و B). سطح زیر منحنی (AUC) جهت دقت در تمایز نمونه بیماران و نمونه کنترل است ($0/99 = \text{highly SM miR-21}$ و $0/87 = \text{moderately SM miR-21}$). حساسیت و اختصاصیت highly SM miR-21 به ترتیب ۰/۹ و ۱) و جهت moderately SM miR-21 به ترتیب ۰/۹ و ۰/۹ می باشد.

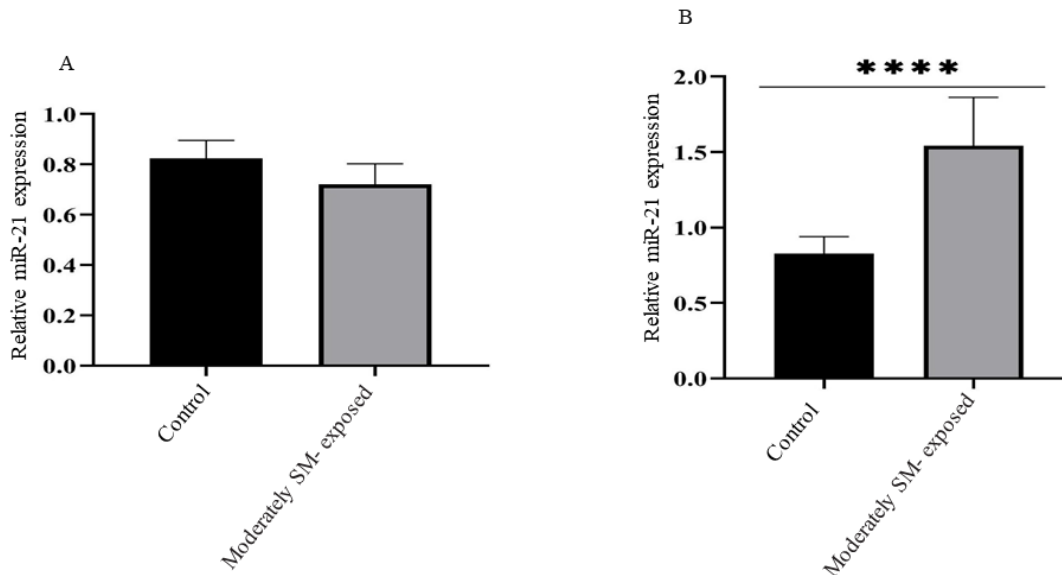
منحنی تکثیر و منحنی ذوب: با توجه به استفاده از رنگ فلورسانس در این تحقیق، جهت تایید بر اتصال صحیح پرایمرها، اطمینان از تکثیر قطعه‌های اختصاصی و بررسی، نبود قطعه‌های غیراختصاصی و دایمر پرایمر در محصول PCR توسط دستگاه StepOnePlus™ Real-Time PCR System منحنی تکثیر و ذوب رسم گردید (شکل ۱ A و B). در این مطالعه با توجه به مشخصات بالینی بیماران در معرض SM و افراد سالم و بهینه سازی miR-21 و 5s rRNA تست Real-Time PCR رسم گردید و مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. نتایج بیان miR-21 در نمونه‌های جانبازان highly SM و moderately SM با سن و افراد نرمال با استفاده از آزمون T-test در نرم افزار GraphPad Prism نسخه 6.07 مورد بررسی قرار گرفت. در مقایسه بیان highly SM miR-21 و moderately SM miR-21 با سن بیماران به ترتیب شاهد $P_{\text{value}} = 0/8049$ و $0/3802$ و $P_{\text{value}} =$ بوده و ارتباط معناداری دیده نشد (شکل ۲A و ۳A).



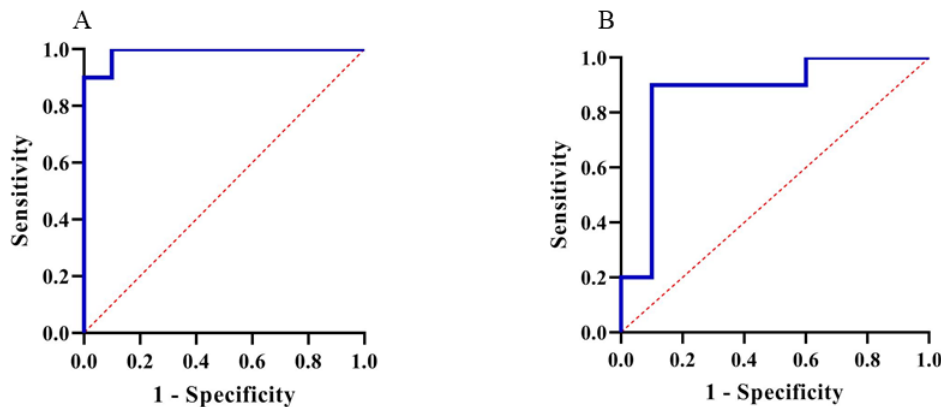
شکل ۱- منحنی ذوب و تکثیر miR-21. (A) منحنی تکثیر miR-21. (B) منحنی ذوب miR-21



شکل ۲- بررسی بیان miR-21 در جانبازان مبتلا به highly SM. (A) بررسی بیان miR-21 در جانبازان مبتلا به highly SM براساس سن. (B) نمودار مقایسه بیان ژن miR-21 در نمونه‌های جانبازان و نمونه‌های کنترل ($P_{value} < 0/0001$). ($P_{value} = 0/3802$)



شکل ۳- بررسی بیان miR-21 در جانبازان مبتلا به moderately SM (A) بررسی بیان miR-21 در جانبازان مبتلا به moderately SM براساس سن ($P_{\text{value}} = 0/8049$). (B) نمودار مقایسه بیان ژن miR-21 در نمونه های جانبازان و نمونه های کنترل ($P_{\text{value}} < 0/0001$).



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

بحث

کراتینوسیت‌ها و همچنین انجام فرایندهای آپوپتوز و نکروز می‌گردد (۳۲، ۴۲). این ماده در دوزهای پایین سبب القای آپوپتوز و در دوزهای بالاتر سبب نکروز بافتی می‌شود. (۳۵). توضیح مکانیسم‌های مولکولی مسمومیت SM همچنان یک موضوع اصلی به منظور توسعه رویکردهای درمانی است. با وجود تحقیقات فشرده، هنوز هیچ پادزهری جهت پیشگیری از SM امروزه در دسترس نیست (۴۰، ۴۶). در حالی که SM تقریباً در تمام بافت‌ها آسیب می‌زند،

SM از عوامل الکیله کننده قوی می‌باشد که با DNA، RNA، پروتئین و لیپیدهای غشا واکنش داده و آنها را الکیله می‌کند (۱۸، ۱۹). به نظر می‌رسد که آسیب به هسته و DNA مهمترین مکانیسم آسیب‌رسانی این ماده باشد. SM از طریق آسیب در سطح DNA می‌تواند باعث ایجاد تغییراتی در بیان ژن‌های مختلف (در جهت افزایش، کاهش و یا روشن و خاموش شدن) شود. به طوری که این امر منجر به آزاد شدن یک سری سایتوکاین‌ها، ایجاد التهاب و فعال شدن

miR-21 در هر دو نمونه بیمار highly SM و moderately SM در سن بالای ۴۵ سال و زیر ۴۵ سال ما شاهد هیچ ارتباط معناداری نبودیم.

نتیجه‌گیری

با مقایسه miRNA نواحی اسکار از جانبازان در معرض SM و نمونه کنترل، مشخص گردید سطح بیان miR-21 به طور قابل توجهی متفاوت و با افزایش بیان به خصوص در نمونه جانبازان highly SM مواجه است. با توجه به نتایج به دست آمده سطح بیان و آنالیز منحنی ROC، miR-21 مورد مطالعه در دو سطح بیماری با توجه به نتایج Cut-off و AUC مشخص گردید که miR-21 می‌تواند جهت تشخیص زود هنگام جانبازان در معرض SM بخصوص نوع شدید (highly SM-exposed patient) و احتمال ابتلا به سرطان پوست باشد.

تشکر و قدردانی

از جناب آقای دکتر علی محمدیان از دانشگاه تربیت مدرس، سرکار خانم دکتر عطیه توکلی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان و سرکار خانم‌ها بهناز میرزایی و شایان علیخانی از مرکز تحقیقات دانشگاه تربیت مدرس برای کمک و همراهی ارزنده کمال تشکر را داریم. این کار با کمک هزینه تحقیقاتی، مرکز تحقیقات پزشکی و مهندسی جانبازان (JMERC) حمایت مالی شد. نویسندگان هیچ تضاد منافی را اعلام نمی‌کنند.

منابع

1. Asangani I.A., Rasheed S.A., Nikolova D.A., Leupold J.H., Colburn N.H., Post S., Allgayer H. 2008. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*, 27(15): 2128-2136.
2. Bartel D.P. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2): 215-233.

مهم‌ترین هدف چشم‌ها، سیستم تنفسی و به ویژه پوست است که در بیش از ۹۰ درصد بیماران ایرانی در معرض آسیب قرار گرفته است (۴، ۵). پس از یک مرحله اولیه بدون علائم ۲ تا ۲۴ ساعت بسته به شرایط مختلف به عنوان مثال دوز و زمان قرار گرفتن در معرض، SM باعث ادم، التهاب، تاول‌های پوستی و زخم می‌شود. بهبود زخم پوست آسیب دیده مختل می‌شود و هفته‌ها تا ماه‌ها طول می‌کشد تا بهبود یابد (۴۰، ۴۶).

microRNA ها ممکن است یک جایگزین تشخیصی مناسب و قابل اعتماد ارائه دهند، که می‌تواند جایگزینی برای روش‌های تشخیصی نادرست‌تر SMV مانند سی‌تی اسکن با وضوح بالا و PFT باشد (۸). در سال ۲۰۱۴ طی یک تحقیقات Wu K و همکاران از ۳۶ مطالعه، miR-21 در گردش را به عنوان یک نشانگر زیستی سرطان‌های مختلف ارزیابی کردند و نشان دادند که این پتانسیل به عنوان ابزاری برای تشخیص زود هنگام است (۵۰). Lánckzy و همکاران در سال ۲۰۱۶ به بررسی بیان miR-21 با بقا در ۵۳ بیمار مبتلا به سرطان پستان پرداختند آنها ارتباط بین سه گروه از چهارگروه مورد نظر را مشاهده کردند (۲۳). Yau TO و همکاران طی تحقیقات به این نتیجه رسیدند که وجود miR-21 می‌تواند در مدفوع انسان می‌تواند نشانگر سرطان روده بزرگ باشد (۵۱). علاوه بر این، Grolmusz VK و همکارانش نشان دادند که به عنوان یک عامل پیش آگهی مستقل در بیماران مبتلا به نئوپلاسم‌های نورواندوکرین پانکراس است (۱۲). در سرطان‌های پستان افزایش بیان (۱۴)، تخمدان افزایش بیان (۱۵)، روده بزرگ افزایش بیان (۱) به ثبت رسیده است.

در این مطالعه نیز همانند سایر تحقیقات دانشمندان ما شاهد افزایش بیان miR-21 در هر دو نمونه بیمار highly SM و moderately SM در مقایسه با نمونه کنترل بوده‌ایم ($p < 0.0001$) به طوری که هرچه بیان بیشتر، عوارض پوستی بیشتری مشاهده گردید. همچنین در رابطه با بیان

Public Health and Institute of Public Health Research, 4(3): 15-23.

11. Graham J.S., Schoneboom B.A. 2013. Historical perspective on effects and treatment of sulfur mustard injuries. *Chemico-Biological Interactions*. 206(3): 512-522.

12. Grolmusz V.K., Kövesdi A., Borka K., Igaz P., Patócs A. 2018. Prognostic relevance of proliferation-related miRNAs in pancreatic neuroendocrine neoplasms. *European Journal of Endocrinology*, 179(4): 219-228.

13. Hu Y., Correa A.M., Hoque A., Guan B., Ye F., Huang J., Swisher S.G., Wu T.T., Ajani J.A., Xu X.C. 2011. Prognostic significance of differentially expressed miRNAs in esophageal cancer. *International Journal of Cancer*, 128(1): 132-143.

14. Iorio M.V., Ferracin M., Liu C.G., Veronese A., Spizzo R., Sabbioni S., Magri E., Pedriali M., Fabbri M., Campiglio M., Ménard S. 2005. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Research*, 65(16): 7065-7070.

15. Iorio M.V., Visone R., Di Leva G., Donati V., Petrocca F., Casalini P., Taccioli C., Volinia S., Liu C.G., Alder H., Calin G.A. 2007. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Research*, 67(18): 8699-8707.

16. Jiang A., Maibach H. 2018. Dermatotoxicology of sulfur mustard: Historical perspectives from World War I. *Journal of Applied Toxicology*, 38(1): 108-112.

17. Kavehie B., Faghihzadeh S., Eskandari F., Kazemnejad A., Ghazanfari T., Soroosh M.R. 2011. Studying the surrogate validity of respiratory indexes in predicting the respiratory illnesses in wounded people exposed to sulfur mustard. *Journal of Arak University of Medical Sciences*, 13(4): 75-82.

18. Kehe K., Balszuweit F., Steinritz D., Thiermann H. 2009. Molecular toxicology of sulfur mustard-induced cutaneous inflammation and blistering. *Toxicology*, 263(1):12-9.

3. Chan J.A., Krichevsky A.M., Kosik K.S. 2005. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Research*, 65(14): 6029-6033.

4. Emadi S.N., Aslani J., Poursaleh Z., Izadi M., Soroush M. Kafashi M. Alavinia S.A. Bakhshi H., Karimi A., Momtaz Manesh K., Babaei A.A. 2012. Comparison late cutaneous complications between exposure to sulfur mustard and nerve agents. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 31(3): 214-219.

5. Emadi S.N., Moeineddin F., Soroush M.R. 2009. Urinary and cutaneous complications of sulphur mustard poisoning preceding pulmonary and ocular involvement: an unusual sequence of symptoms. *Clinical and Experimental Dermatology: Clinical Dermatology*, 34(5): e7-e10.

6. Etemad L., Moshiri M., Balali Mood M. 2019. Advances in treatment of acute sulfur mustard poisoning—a critical review. *Critical Reviews in Toxicology*, 49(3): 191-214.

7. 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.

8. Gharbi S., Khateri S., Soroush M.R., Shamsara M., Naeli P., Najafi A., Korsching E., Mowla S.J. 2018. MicroRNA expression in serum samples of sulfur mustard veterans as a diagnostic gateway to improve care. *PLoS One*, 13(3): e0194530.

9. 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.

10. 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 and cancer in Iranian soldiers of imposed war in Isfahan Province: A Pilot Study. *Journal of School of*

- suggested by in vitro cell culture models. *Toxicology Letters*, 293: 91-97.
29. Meng F., Henson R., Wehbe Janek H., Ghoshal K., Jacob S.T., Patel T. 2007. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*, 133(2): 647-658.
30. Naghii M.R. 2002. Sulfur mustard intoxication, oxidative stress, and antioxidants. *Military Medicine*, 167(7): 573-575.
31. Pal A., Tewari Singh N., Gu M., Agarwal C. Huang J., Day B.J., White C.W., Agarwal R. 2009. Sulfur mustard analog induces oxidative stress and activates signaling cascades in the skin of SKH-1 hairless mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(11): 1640-1651.
32. Petrau J.P., Oglesby S.B., Justus B.T.A. 1991. Morphologic effects of sulfur mustard on a human skin equivalent. *Cutaneous and Ocular Toxicology*. 10(4): 315-324.
33. Poursaleh Z., Ghanei M., Babamahmoodi F., Izadi M., Harandi A.A., Emadi S.E., Taghavi N.H.O.S., Sayad Nouri S.S., Emadi S.N. 2012. Pathogenesis and treatment of skin lesions caused by sulfur mustard. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 31(3): 241-249.
34. Rice P. 2003. Sulphur mustard injuries of the skin. *Toxicological Reviews*, 22(2): 111-118.
35. Rosenthal D.S., Simbulan Rosenthal C.M., Iyer S., Smulson M.E., Spoonde A., Smith W., Ray R. 1998. Sulfur mustard induces markers of terminal differentiation and apoptosis in keratinocytes via a Ca²⁺-calmodulin and caspase-dependent pathway. *Journal of Investigative Dermatology*, 111(1): 64-71.
36. Saladi R.N., Smith E., Persaud A.N. 2006. Mustard: a potential agent of chemical warfare and terrorism. *Clinical and Experimental Dermatology: Clinical Dermatology*, 31(1): 1-5.
37. Salamati P., Razavi S.M. 2015. The late clinical and forensic symptoms and signs of sulfur mustard. *Burns*, 41(6): 1370-1371.
19. Kehe K., Thiermann H. 2009. Clinical picture of sulfur mustard poisoning. *Toxicology*, 263(1): 1-1.
20. Kehe K., Thiermann H., Balszuweit F. Eyer F. Steinritz D., Zilker T. 2009. Acute effects of sulfur mustard injury Munich experiences. *Toxicology*, 263(1): 3-8.
21. 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. *Journal of occupational and Environmental Medicine*, 45(11): 1136-1143.
22. Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tuschl T. 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294(5543): 853-858.
23. Lániczky A., Nagy Á., Bottai G., Munkácsy G., Szabó A., Santarpia L., Györfly B. 2016. miRpower: a web-tool to validate survival-associated miRNAs utilizing expression data from 2178 breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, 160(3): 439-446.
24. Lowenstein E.B. 2011. A history of sulfur mustard. *Skinmed*, 9(5): 310-311.
25. Lui W.O., Pourmand N., Patterson B.K., Fire A. 2007. Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer. *Cancer Research*, 67(13): 6031-6043.
26. Malaviya R., Sunil V.R., Cervelli J., Anderson D.R., Holmes W.W., Conti M.L., Gordon R.E., Laskin J.D., Laskin D.L. 2010. Inflammatory effects of inhaled sulfur mustard in rat lung. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 248(2): 89-99.
27. Mann J., Mann D.A. 2013. Epigenetic regulation of wound healing and fibrosis. *Current Opinion in Rheumatology*, 25(1): 101-107.
28. Menacher G., Steinritz D., Schmidt A. Popp T. Worek F. Gudermann T. Thiermann H., Balszuweit F. 2018. Effects of anti-inflammatory compounds on sulfur mustard injured cells: Recommendations and caveats

- fixed paraffin embedded tissues. *Endocrine Pathology*, 18(3): 163-173.
46. Thiermann H., Worek F., Kehe K. 2013. Limitations and challenges in treatment of acute chemical warfare agent poisoning. *Chemico-Biological Interactions*, 206(3): 435-443.
47. Volinia S., Calin G.A., Liu C.G., Ambs S., Cimmino A., Petrocca F., Visone R., Iorio M., Roldo C., Ferracin M., Prueitt R.L. 2006. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(7): 2257-2261.
48. Wattana M., 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.
49. Wolfe G.A., Petteys S.M., Phelps J.F., Wasmund J.B., Plackett T.P. 2019. Sulfur mustard exposure: review of acute, subacute, and long-term effects and their management. *Journal of Special Operations Medicine: a Peer Reviewed Journal for SOF Medical Professionals*, 19(2): 81-86.
50. Wu K., Li L., Li S. 2015. Circulating microRNA-21 as a biomarker for the detection of various carcinomas: an updated meta-analysis based on 36 studies. *Tumor Biology*, 36(3): 1973-1981.
51. Yau T.O., Tang C.M., Harriss E.K., Dickins B., Polyarchou C. 2019. Faecal microRNAs as a non-invasive tool in the diagnosis of colonic adenomas and colorectal cancer: A meta-analysis. *Scientific Reports*, 9(1): 1-13.
52. Zafarghandi M.R., Soroush M.R., Mahmoodi M., Naieni K.H., Ardalan A., Dolatyari A., Falahati F., Mirmohammadkhani M., Mousavi B., Ghanei M. 2013. Incidence of cancer in Iranian sulfur mustard exposed veterans: a long-term follow-up cohort study. *Cancer Causes and Control*, 24(1): 99-105.
38. Sanderson H., Fauser P., Thomsen M., Sørensen P.B. 2009. Human health risk screening due to consumption of fish contaminated with chemical warfare agents in the Baltic Sea. *Journal of Hazardous Materials*, 162(1): 416-422.
39. Schmidt A., Scherer M., Thiermann H., Steinritz D. 2013. Mesenchymal stem cells are highly resistant to sulfur mustard. *Chemico-Biological Interactions*, 206(3): 505-511.
40. Schmidt A., Steinritz D., Thiermann H., Meineke V., Abend M. 2016. Alteration of miRNA expression in early endothelial cells after exposure with sub-lethal sulfur mustard concentrations. *Toxicology Letters*, 244: 88-94.
41. Shakarjian M.P. Heck D.E. Gray J.P. Sinko P.J. Gordon M.K. Casillas R.P. Heindel N.D. Gerecke D.R. Laskin D.L., Laskin J.D. 2010. Mechanisms mediating the vesicant actions of sulfur mustard after cutaneous exposure. *Toxicological Sciences*, 114(1): 5-19.
42. Smith K.J., Hurst C.G., Moeller R.B., Skelton H.G., Sidell F.R. 1995. Sulfur mustard: its continuing threat as a chemical warfare agent, the cutaneous lesions induced, progress in understanding its mechanism of action, its long-term health effects, and new developments for protection and therapy. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 32(5): 765-776.
43. Steinritz D., Lang S., Popp T., Siebert M., Rothmiller S., Kranawetvogl A., Schmidt A., John H., Gudermann T., Thiermann H., Kehe K. 2019. Skin sensitizing effects of sulfur mustard and other alkylating agents in accordance to oecd guidelines. *Toxicol Letters*, 314: 172-180.
44. Tahmasbpour E., Reza Emami S., Ghanei M., Panahi Y. 2015. Role of oxidative stress in sulfur mustard-induced pulmonary injury and antioxidant protection. *Inhalation Toxicology*, 27(13): 659-672.
45. Tetzlaff M.T., Liu A., Xu X., Master S.R., Baldwin D.A., Tobias J.W., Livolsi V.A., Baloch Z.W. 2007. Differential expression of miRNAs in papillary thyroid carcinoma compared to multinodular goiter using formalin

Investigating the Changes of miR-21 Expression in the Skin Sample of Veterans Exposed to Mustard Gas during Iran-Iraq War

Mohadeseh Valizadeh ¹, Masoud Soleimani ^{2*}, Shiva Irani ¹, Mohammad Reza Nourani ³,
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-
Department of Cell Therapy and Hematology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Nanobiotechnology Research Center, Baqiyatullah University, Tehran, Iran

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

Abstract

Mustard sulfur (SM) is a blister and has destructive effects on the lungs, eyes, and skin. MicroRNAs are non-coding RNA molecules that regulate many important cellular pathways. The clear association of microRNA expression changes in a wide range of diseases and their interception in various organs of the body, including the skin, has made them a suitable biomarker. This study aims at evaluating the changes in miR-21 gene expression in chemical warfare victims infected with SM. In this study, skin biopsy specimens including 10 veterans exposed to SM with moderate complications, 10 veterans exposed to SM with severe complications, and 10 control samples were collected, and then total RNA was extracted. cDNA synthesis was performed. MiR-21 gene expression was assessed using real-time PCR. 5 s rRNA gene was used as the internal control. Graph Pad Prism software version 6.07 was used for the statistical analysis of data. Roc curve was used to evaluate the biomarker value of the miR-21 gene. Increased expression of the miR-21 gene was observed in samples of SM veterans compared with normal samples. There was a statistically significant difference in the expression of the miR-21 gene in the skin samples of veterans exposed to SM with moderate complications and veterans exposed to SM with severe complications compared with the samples of control skin (P-value<0.0001). The expression of the miR-21 gene in the skin samples of veterans exposed to SM with severe complications and veterans exposed to SM with moderate complications in old age was not significantly related to the control sample (P-value = 0.8049, P-value = 0.3802). This study showed that the relative expression of miR-21 could be a potential biomarker in distinguishing SM veterans from healthy individuals but needs further researches.

Keywords: Gene expression, miR-21, Skin, Sulfur mustard, Biomarker

