



بررسی اثر دگرامتاژون بر سایتوکاین‌ها و بیان ژن‌ها منتخب دخیل در فیروز: مطالعه در مدل موشی فیروز ریوی ایدیوباتیک

صابر مهدی زاده: گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
مرجان طاهریان: گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران، و مرکز تحقیقات ایمونولوژی و عفونت‌های میکروبی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

کاظم موسوی زاده: گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

سالار پشنگ زاده: گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران، و مرکز تحقیقات ایمونولوژی و عفونت‌های میکروبی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

پریا بیاتی: گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران، و مرکز تحقیقات ایمونولوژی و عفونت‌های میکروبی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

علی آنسیان: گروه پاتولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ابهر، ابهر، ایران

نازنین مجتبی: گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران، و مرکز تحقیقات ایمونولوژی و عفونت‌های میکروبی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران (* نویسنده مسئول) mojtabavi.n@iums.ac.ir

چکیده

کلیدواژه‌ها

بلئومایسین،

فیروز ریوی ایدیوباتیک،

CTGF

ET-1

TNF- α

TGF- β

دگرامتاژون

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۱۷

تاریخ چاپ: ۱۴۰۲/۰۶/۱۸

زمینه و هدف: فیروز ریوی ایدیوباتیک (IPF), یک بیماری التهابی مزمن، پیشرونده ریه و عملدأ کشنده با متوسط بقای ۲ تا ۳ سال می‌باشد. از آنجا که فرآیندهای التهابی مزمن در ریه نقش عمده‌ای در ایجاد و توسعه این

بیماری ایفا می‌کند، درمان با گلوکورنیکوئیدهای نظیر دگرامتاژون (عوامل ضد التهاب با طیف گسترده) در درمان IPF مطرح می‌باشد.

هر چند مکانیسم عملکرد ضد فیروزی این داروها به طور کامل شناخته نشده است و کارآیی آنها همچنان مورد بحث می‌باشد. در این مطالعه بررسی تاثیر داروی دگرامتاژون در مدل IPF انجام گردید.

روش کار: تیمار با دگرامتاژون در مدل موشی فیروز ریوی القاء شده تو سط تلقیح داخل تراشهای بلئومایسین انجام شد. فیروز ایجاد شده از طریق سنجش‌های هیستوتولوژیکی و اندازه گیری هیدروکسی پرولین در بافت ریه صورت گرفت. سنجش میزان سایتوکاین‌های TNF- α و TGF- β و TNF- α به روش الایزا و بیان ژن‌های ET-1 و CTGF و TGF- β و TNF- β و TNF- α از طریق RT-PCR انجام شد.

یافته‌ها: نتایج حاکی از ایجاد فیروز و افزایش رسوپ کلاژن، و افزایش معنی دار پروتئین‌های TNF- β و TNF- α و TGF- β و TNF- α در بافت ریه، به دنبال تلقیح بلئومایسین بود. تیمار با دگرامتاژون باعث کاهش میزان رسوپ کلاژن، سطوح ET-1 و CTGF و TNF- α و کاهش بیان افزایش یافته ژنهای CTGF و ET-1 و TGF- β و TNF- α در موش‌های درگیر فیروز ریه شد.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه نشان داده شد که دگرامتاژون از طریق کاهش چشمگیر میزان TGF- β و TNF- α و ET-1 و CTGF باعث تخفیف فیروز ریوی القاء شده تو سط بلئومایسین می‌شود.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منع حمایت‌کننده: حامی مالی ندارد.

شیوه استناد به این مقاله:

Mehdizadeh S, Taherian M, Mousavizadeh K, Pashangzadeh S, Bayati P, Anissian A, Mojtabavi N. Scrutiny of the Effect of Dexamethasone on Cytokines and Expression of Selected Genes Involved in Fibrosis: A Study in a Mouse Model of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Razi J Med Sci. 2023;30(6): 195-205.

* انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.



Original Article

Scrutiny of the Effect of Dexamethasone on Cytokines and Expression of Selected Genes Involved in Fibrosis: A Study in a Mouse Model of Idiopathic Pulmonary Fibrosis

Saber Mehdizadeh: Department of Immunology (School of Medicine) and Immunology Research Center (Institute of Immunology and Infectious Diseases), Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Marjan Taherian: Department of Immunology (School of Medicine) and Immunology Research Center (Institute of Immunology and Infectious Diseases), Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Kazem Mousavizadeh: Department of Pharmacology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Salar Pashangzadeh: Department of Immunology (School of Medicine) and Immunology Research Center (Institute of Immunology and Infectious Diseases), Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Paria Bayati: Department of Immunology (School of Medicine) and Immunology Research Center (Institute of Immunology and Infectious Diseases), Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Ali Anissian : Department of Pathology, Islamic Azad university of Abhar, Abhar, Iran

 **Nazanin Mojtabavi:** Department of Immunology (School of Medicine) and Immunology Research Center (Institute of Immunology and Infectious Diseases), Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (* Corresponding author) mojtabavi.n@iums.ac.ir

Abstract

Background & Aims: Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a devastating chronic form of interstitial lung disease, characterized by an inflammatory infiltrate, deposition of extracellular matrix (ECM) components like collagen, and change in the architectural lung parenchyma. IPF has a poor prognosis and is lethal, with a median survival of 2 to 3 years. The etiology of the disease is obscure; however, several studies indicated that the disease is initiated by inflammation and the release of profibrotic growth factor, namely transforming growth factor β (TGF- β). The definitive treatment for patients has not yet been approved. Although. However, evidence suggests that inflammation plays an essential role in the development and pathogenesis of IPF as a stimulus. However, inflammation is sometimes referred to as a secondary event in fibrosis, partly due to the failure of anti-inflammatory drugs in clinical trials. Therefore, more studies are needed to evaluate the effectiveness of anti-inflammatory therapies. In primary injury or inflammation, TGF- β , a critical cytokine and regulator of fibrosis, promotes inflammation and increases the activity and proliferation of fibroblasts at the site of inflammation, differentiation into myofibroblasts, and production of extracellular matrix, leading to severe pulmonary fibrosis. As a downstream mediator, the connective tissue growth factor (CTGF) is induced by TGF- β and promotes its fibrotic effects, enhancing lung fibrosis through fibroblast proliferation and collagen deposition. Evidence has shown that CTGF expression is increased in fibroblasts of IPF patients. In addition, Endothelin-1 (ET-1) is another downstream mediator of TGF- β fibrogenic responses in fibroblasts, which produces an extracellular matrix and differentiates fibroblasts into myofibroblasts. Also, the expression of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), which in addition to its inflammatory properties, also has fibrogenic properties, is significantly increased in the lungs of IPF patients. This expression is associated with increased fibroblasts and the deposition of extracellular matrix proteins in the interstitial region of the lung. In general, these findings indicate that these factors are reasonable targets for designing treatment strategies or evaluating the effect of proposed drugs in the treatment of IPF.

Broad-acting anti-inflammatory molecules, including glucocorticoids like Dexamethasone, were considered potential therapy. Glucocorticoids are anti-inflammatory agents that can reduce pro-inflammatory molecules by suppressing cellular and humoral immunity. Dexamethasone is one of the most potent glucocorticoid drugs; however, despite the various investigations on the inhibition of pulmonary fibrosis, its anti-fibrosis effects are still debated, and there are contradictory findings in this regard. Also, the underlying mechanism of its impact on IPF is not clear. Therefore, in this study, the therapeutic effect of Dexamethasone on pulmonary fibrosis was scrutinized, based on the impact of various players of this scenario, namely the expression of TGF- β , TNF- α , CTGF, ET-1 and hydroxyproline.

Methods: 6 to 8 week-old male mice were used in this study. All animal care conditions, including temperature, light, and humidity, were observed. Mice aged 8-10 weeks were randomly divided into the following groups, and ten mice were placed in each group.

1. Control group treated with normal saline (Control)
2. Bleomycin inoculated group on day one (BLM)
3. Bleomycin inoculated on day one and dexamethasone-treated for 14 days (BLM+DEXA)

Keywords

Bleomycin,
Idiopathic pulmonary
fibrosis (IPF),
CTGF,
ET-1,
TNF- α ,
TGF- β ,
Dexamethasone

Received: 08/07/2023

Published: 09/09/2023

The experiments were performed according to the approved guideline from the Faculty Ethics Committee (IR.IUMS.FMD.REC1396.9511127007). Lung fibrosis was induced intratracheal in anesthetized mice using 50 μ L bleomycin (5mg/kg) by a single dose. The intervention with Dexamethasone (1mg/Kg/day) was done by 14 days intraperitoneal injection under sterile conditions. The mice were euthanized on day 21 under deep anesthesia, and their lungs were extracted. For evaluation, architectural changes occurred in the lungs based on bleomycin administration and dexamethasone intervention; the left lungs were fixed in formalin. The right lungs were frozen in liquid nitrogen for RNA extraction, gene expression analysis, ELISA, and hydroxyproline assay and were stored at -80 °C. After 24 hours of immersion in formalin, paraffin blocks were prepared from the left lungs, and tissue incisions were made and transferred to the slide. After paraffin removal and leaching of slides, pathological examinations were performed using Masson Trichrome staining. The amount of hydroxyproline was measured using a hydroxyproline kit. Quantitative measurement of mRNA from CTGF and ET-1 genes in the lungs of mice was performed using real-time PCR. Data analysis of different groups was performed using Prism software and one-way ANOVA and Tukey multiple comparison test.

In order to evaluate the anti-fibrotic effect of Dexamethasone in IPF, the bleomycin-induced mouse model was treated with Dexamethasone. After fibrosis was induced by intratracheal BLM administration, histopathological evaluation and hydroxyproline assay, ELISA for measurement of TGF- β and TNF- α , and RT-PCR were performed to evaluate the expression CTGF and ET-1 genes.

Results: Histological examination indicated the deposition of collagen after administration of one dose of Bleomycin; an enzymatic analysis of hydroxyproline showed that administration of a single dose of BLM intratracheally leads to extensive fibrosis in the lungs of C57BL/6 mice on day 21. In comparison, 14 days of intraperitoneal treatment with Dexamethasone reduced the severity of fibrosis. Histological examination of Mason trichrome-stained tissue sections from lungs of control mice (receiving saline intratracheally) showed normal lung structure including no extracellular matrix deposition (based on the absence of blue color in the interstitium) and the alveolar space was distinct. While the lung tissue sections of BLM mice showed histopathological changes, including increased fibrotic areas and increased collagen deposition (based on increased blue color), and decreased alveolar spaces compared to the control group. However, lung tissue sections from dexamethasone-treated mice (BLM+DEXA group) showed only mild fibrosis. Dexamethasone treatment reduced the amount of hydroxyproline compared to the Bleomycin treated group; however, this reduction was not statistically significant ($P > 0.05$). Dexamethasone treatment significantly reduced TGF- β levels in the lungs of the BLM + DEXA group compared with the BLM group ($P < 0.001$). Further, treatment of received Bleomycin (BLM) received mice with Dexamethasone (BLM + DEXA) reduced the amount of TNF- α when compared with Bleomycin received only group nevertheless, this reduction was not statistically significant to mice but statistically significant ($P < 0.05$). The levels of TNF- α and TGF- β in the lungs of Bleomycin treatment mice (BLM) were higher when compared with Normal saline-treated mice (Control) ($P < 0.001$). Dexamethasone treatment can induce its effect by inhibiting a prominent signaling pathway, namely TGF- β . Further, Dexamethasone treatment of Bleomycin received mice significantly reduced the expression of CTGF gene ($P < 0.001$). CTGF expression occurs before the TGF- β cytokine is expressed during the phenomenon of fibrosis. It seems that CTGF is responsible for extracellular accumulation in the fibrosis pathway. In addition, 14 days of treatment of Bleomycin received mice with Dexamethasone reduced ET-1 genes in the lungs of the BLM+DEXA group compared with the BLM group ($P < 0.001$). ET1 gene is responsible for the differentiation of fibroblasts to myofibroblasts.

It is known that Dexamethasone can ameliorate fibrosis; however, it is not known how this steroid can induce its effect or whether its impact is based on its role in the inhibition of inflammation

Conclusion: Our findings showed that intratracheal inoculation of Bleomycin in mice resulted in extensive accumulation of extracellular matrix in the lungs of C57BL/6 mice. Our study demonstrated that administration of Dexamethasone attenuated Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in C57BL/6 mice by reducing hydroxyproline, production of two critical cytokines, the TGF- β and TNF- α , also by reduction of CTGF and ET-1 gene expression. Still, further investigations are required to understand how this compound can reduce fibrosis.

Conflicts of interest: None

Funding: None

Cite this article as:

Mehdizadeh S, Taherian M, Mousavizadeh K, Pashangzadeh S, Bayati P, Anissian A, Mojtabavi N. Scrutiny of the Effect of Dexamethasone on Cytokines and Expression of Selected Genes Involved in Fibrosis: A Study in a Mouse Model of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Razi J Med Sci. 2023;30(6): 195-205.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

مقدمه

β را کاهش داده یا عوامل موثر در پایین دست آن را هدف قرار می دهنند، اخیراً مورد توجه قرار گرفته اند. فاکتور رشد بافت همبند (Connective tissue growth factor, CTGF) توسط TGF- β القاء شده و اثرات فیبروتیک آن را پیش می برد و باعث تقویت فیبروز ریوی بواسطه تکثیر فیبروبلاست و رسوب کلژن می شود (۱۷). شواهد نشان داده اند که بیان CTGF در فیبروبلاست های مبتلایان به IPF و همچنین در موش های تیمار شده با بلؤومایسین تشديد می شود (۱۸، ۱۹). علاوه بر این، اندوتلین-۱ (Endothelin-1, ET-1) یک واسطه پایین دست پاسخ های فیبروتیک TGF- β در فیبروبلاست ها است که باعث تولید ماتریکس خارج سلولی و تمایز فیبروبلاست به میوفیبروبلاست می شود (۲۰)، در بیماران مبتلا به IPF و مدل فیبروز ریوی ناشی از بلؤومایسین در رت بیان ET-1 افزایش می یابد (۲۱، ۲۲). همچنین، بیان فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF- α)، که علاوه بر خاصیت التهابی، ویژگی های فیبروتیک نیز دارد، در ریه بیماران مبتلا IPF افزایش زیادی دارد و این بیان، با افزایش فیبروبلاست ها و رسوب پروتئین های ماتریکس خارج سلولی در ناحیه بینابینی ریه مرتبط می باشد (۲۳). به طور کلی این یافته ها نشان می دهنند که عوامل ذکر شده اهداف مناسبی جهت طراحی استراتژی های درمانی یا بررسی اثر داروهای پیشنهادی در درمان IPF می باشند.

کورتیکواستروئیدها، عوامل ضد التهابی هستند که با سرکوب اینمی سلولی و هومورال، میزان مولکول های پیش التهابی را کاهش می دهنند. با توجه به عملکرد سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی و نقش التهاب در شروع و تداوم پاتوبیولوژی IPF، کورتیکواستروئید ها، در درمان این بیماری مطرح می باشند (۲۴). دگزامتاzon، یکی از قوی ترین داروهای گلوکوکورتیکوئیدی می باشد، اما علی رغم مطالعاتی که تا کنون در خصوص تاثیر آن در مهار فیبروز ریوی صورت گرفته است، اثرات ضد فیبروزی آن همچنان مورد بحث بوده و یافته های ضد و نقیضی در این باره وجود دارد (۲۵-۲۶). همچنین مکانیسم اثر آن در IPF به طور کامل مشخص نشده است. لذا در این مطالعه ضمن تایید اثر درمانی دگزامتاzon بر فیبروز ریوی، تاثیر آن بر فاکتور های

فیبروز ریوی ایدیوپاتیک (Idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) یک بیماری التهابی مزمن و پیشرونده است که با تکثیر فیبروبلاست ها و رسوب اجزای ماتریکس خارج سلولی در ریه مشخص می شود (۲، ۱). IPF شایع ترین فرم فیبروز ریوی و عمدهاً کشنده است و متوسط بقای بیماران ۲ تا ۳ سال می باشد (۳). تاکنون درمان قطعی برای این بیماران به تایید نرسیده است. استراتژی های درمانی پیشنهاد شده برای این بیماری شامل کورتیکواستروئیدها و سایر سرکوب کننده های سیستم ایمنی، ترکیبات سیتو توک سیک، و همچنین ترکیبات ضد فیبروزی می باشد (۴، ۵).

اگرچه علت دقیق IPF ناشناخته است، اما از مدت ها پیش فرآیند التهاب مزمن در ریه مکانیسم اصلی این بیماری در نظر گرفته شده است (۶-۸). هر چند اخیراً پاتوژن IPF در درجه اول یک فرآیند فیبروتیک محسوب می شود که در آن آسیب های مکرر به اپیتیال آلوئول، همراه با پاسخ های خارج از تنظیم در ترمیم اپیتیال آسیب دیده و اختلال عملکرد فیبروبلاست ها منجر به تغییر شکل مدام بافت و فیبروز، به عنوان مرحله نهایی بیماری شده و از ساز و کارهای دخیل در IPF می باشند (۹). با این حال، شواهد نشان داده اند که التهاب یکی از عوامل نقش آفرین در ایجاد و پاتوژن IPF می باشد (۱۰). اما گاهی نیز از التهاب به عنوان یک پدیده ثانویه در فیبروز یاد شده است، که این دیدگاه تا حدودی به دلیل شکست داروهای تعديل کننده التهاب، در آزمایش های بالینی ایجاد شده است (۱۱، ۱۲). به همین دلیل بررسی میزان اثر بخشی داروهای ضد التهابی نیازمند مطالعات بیشتری است.

در آسیب یا التهاب اولیه، TGF- β ، سایتوکاین کلیدی و تنظیم کننده فیبروز، باعث پیشبرد التهاب و افزایش فعالیت و تکثیر فیبروبلاست ها در محل التهاب، تمایز به میوفیبروبلاست ها و تولید ماتریکس خارج سلولی شده و منجر به فیبروز ریوی شدید می گردد (۱۳، ۱۴). بنابراین مهار این سایتوکاین یک درمان بالقوه در درمان IPF می باشد. اما از آنجا که مهار مستقیم این سایتوکاین پلوتروپیک می تواند عوارض جانبی بسیار نامطلوبی، از جمله ابتلا به سرطان ریه در بیماران IPF را در پی داشته باشد (۱۵)، لذا درمان هایی که اثرات TGF-

۲۱، تحت بیهودگی عمیق معدوم شدن و ریه‌های آنها استخراج گردید.

این طرح دارای کد اخلاق IR.IUMS.FMD.REC1396.9511127007 می‌باشد.

جمع آوری نمونه‌های بافت ریه: ریه سمت چپ موش‌ها تهیه بلوک‌های پارافینی و بررسی‌های پاتولوژی، در فرمالین فیکس شدند. ریه سمت راست، در حضور نیتروژن مایع به سه قسمت جداگانه جهت استخراج RNA، بررسی بیان ژن، انجام الایزا و سنجش هیدروکسی پرولین تقسیم گردید و در -80°C نگهداری شد.

بررسی‌های پاتولوژیک: ریه سمت چپ موش‌ها پس از ۲۴ ساعت غوطه وری در فرمالین و تولید بلوک‌های پارافینی توسط دستگاه میکروتوم برش داده شدند و برش‌های $4\text{ }\mu\text{m}$ ایجاد و روی لام منتقل شدند. پس از پارافین زدایی و آبدهی لام‌ها، رنگ آمیزی ماسون تریکروم (Masson's trichrome) با استفاده از کیت رنگ تریکرم بافت موسسه تحقیقاتی و تولیدی شیمی پژوهش آسیا، مطابق با دستورالعمل انجام گردید. کلازن بافت‌های رنگ آمیزی شده با رنگ ماسون تریکروم در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شد. در این رنگ آمیزی کلازن به رنگ آبی، هسته‌ها به رنگ سیاه، سیتوپلاسم، کراتین، فیبرهای عضلانی و بین سلولی به رنگ قرمز دیده شدند. بنابراین افزایش رنگ آبی نشانگر افزایش میزان کلازن بود.

روش اندازه‌گیری هیدروکسی پرولین در بافت ریه: بافت‌های ریه فریز شده، تو سطح 6 HCl و مولار و دمای 110°C هضم شدند. سپس، مایع رویی به چاهک‌های پلیت الایزا منتقل و ادامه مراحل با استفاده از کیت سنجش هیدروکسی پرولین (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) و بر طبق دستورالعمل آن انجام گردید و در انتها رنگ سنگی تو سطح دستگاه الایزا ریدر با طول موج 570 nm نانومتر صورت گرفت و غلاظت هیدروکسی پرولین محاسبه شد.

الایزا: به منظور بررسی تاثیر دگرگامتازون بر میزان سایتوکاین‌های TNF- β و TGF- α موجود در بافت ریه، پس از کوبیدن و خرد کردن بافت در هاون به همراه

پروفیرووتیک مانند CTGF- β , TNF- α , ET-1 و مطالعه موش‌های ۶-۸ هفته‌نر از نژاد C57BL/6، از موسسه رویان تهران خریداری شدند. این موش‌ها به مدت دو هفته دوران قرنطینه را سپری کردند. سپس موش‌ها بصورت تصادفی به گروه‌های زیر تقسیم‌بندی شدند؛

۱. گروه کنترل (Control) تیمار شده با سرم فیزیولوژی (Normal saline)

۲. گروه تیمار شده بلئومایسین (BLM)، تزریق بلئومایسین در روز یک.

۳. گروه تیمار شده با بلئومایسین و دگرگامتازون (BLM+DEXA)، تزریق بلئومایسین در روز یک و درمان با دگرگامتازون از روز یک تا روز ۱۴ به صورت روزانه

روش القاء مدل فیروز ریوی ناشناخته (IPF) در موش‌ها و مداخله با دگرگامتازون: موش‌های نر ۶ تا ۸ هفته‌ای خریداری شده در مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی ایران "Experimental and Comparative Studies" به منظور تطابق با محیط آزمایشگاهی و رسیدن به وزن مطلوب، ۲ هفته قرنطینه شدند. تمامی شرایط نگهداری حیوانات شامل دما، نور و رطوبت رعایت گردید. پس از گذشت این مدت، موش‌های ۸-۱۰ هفته بطور تصادفی در گروه‌های ذکر شده تقسیم شدند و در هر گروه ۱۰ موش قرار داده شد. انجام آزمایش‌ها بر طبق پروتکل‌های تایید شده توسط کمیته اخلاق دانشگاه انجام گرفت.

جهت القاء فیبرز، موشها تحت بیهودگی $50\text{ }\mu\text{L}$ سرم فیزیولوژی یا بلئومایسین (5 mg/kg) را به صورت تک دوز توسط سرنگ گاواز ظرفی داخل تراشه دریافت کردند.

مداخله با دگرگامتازون: دگرگامتازون (1 mg/kg/day) روزانه از روز یک به مدت ۱۴ روز داخل صفاقی در شرایط استریل به موش‌ها تزریق شد. موش‌ها در روز

روش کار

حیوانات و گروه‌های مورد مطالعه: موش‌های ۶-۸ هفته‌نر از نژاد C57BL/6، از موسسه رویان تهران خریداری شدند. این موش‌ها به مدت دو هفته دوران قرنطینه را سپری کردند. سپس موش‌ها بصورت تصادفی به گروه‌های زیر تقسیم‌بندی شدند؛

۱. گروه کنترل (Control) تیمار شده با سرم فیزیولوژی (Normal saline)

۲. گروه تیمار شده بلئومایسین (BLM)، تزریق بلئومایسین در روز یک.

۳. گروه تیمار شده با بلئومایسین و دگرگامتازون (BLM+DEXA)، تزریق بلئومایسین در روز یک و درمان با دگرگامتازون از روز یک تا روز ۱۴ به صورت روزانه

نسبی mRNA ژن‌ها با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (فرمولی که به منظور محااسبه بیان نسبی mRNA ژن در نمونه‌ها هنگام انجام qRT-PCR استفاده می‌شود) ارزیابی (۲۷) و با استفاده از سطح بیان mRNA ژن (Housekeeping genes) GUSB آنالیز آماری داده‌ها: آنالیز یافته‌های گروه‌های مختلف مورد مطالعه با نرم افزار Prism نسخه ۸.۱ و با استفاده از آزمون آماری One way ANOVA و multiple comparison test انجام گردید.

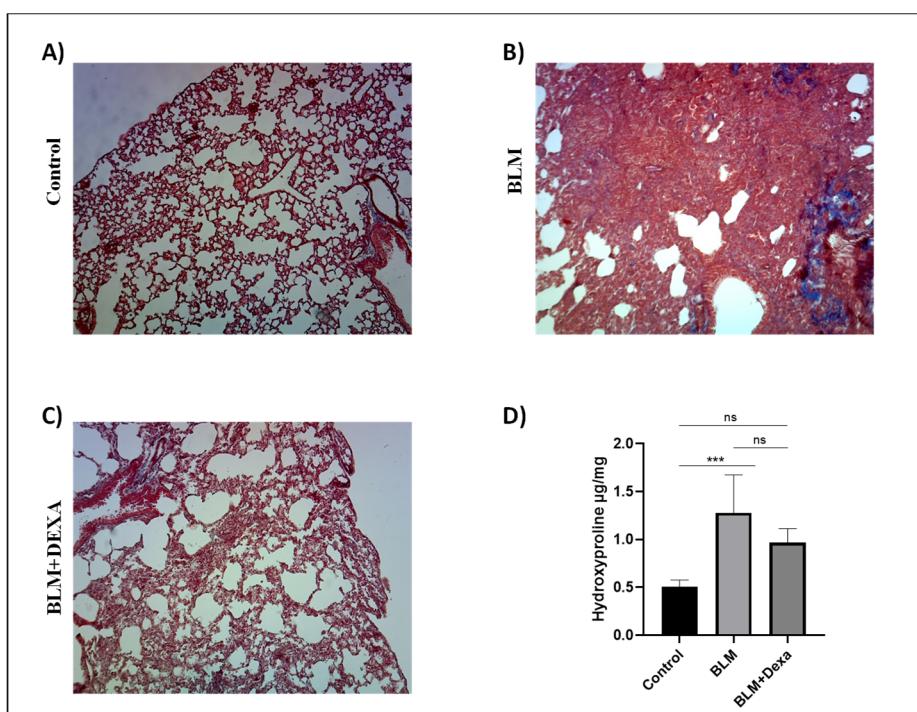
آنالیز آماری داده‌ها: آنالیز یافته‌های گروه‌های مختلف مورد مطالعه با نرم افزار Prism نسخه ۸.۱ و با استفاده از آزمون آماری One way ANOVA و multiple comparison test انجام گردید.

یافته‌ها

ارزیابی میزان فیبروز در مدل موشی فیبروز ریوی و تاثیر مداخله با دگزامتاژون: بررسی بافت شناسی و سنجش آنزیمی هیدروکسی پرولین نشان دادند که تک دوز BLM به صورت داخل تراشه‌ای، منجر به ایجاد فیبروز گسترده در ریه موش‌های C57BL/6، در روز ۲۱ بعد از تلقیح می‌شود. در حالی که ۱۴ روز تیمار با

نیتروژن مایع، بافت‌ها در بافر لیز کننده حاوی مهارکننده پروتئاز، لیز شدند و اندازه‌گیری TGF- β طبق دستورالعمل کیت (DY1679-05 R&D) و α طبق دستورالعمل کیت (3511-1H-6 MabTech) انجام گردید.

استخراج RNA و آنالیز بیان ژن به روش Real-Time PCR سنجش کمی mRNA ژن‌های CTGF و ET-1 در ریه موش‌های گروه‌های مختلف با استفاده از روش Real-time PCR انجام شد. بافت‌های ریه به قطعات کوچک برش داده شدند و در نیتروژن مایع کوبیده و سپس در تیوب حاوی (Sinaclon, Iran) RNX-Plus هموژنیزه شدند و طبق دستورالعمل (RNX-Plus, Sinaclon, Iran) از بافت هموژنیزه شده استخراج (cDNA cDNA synthesis, yektatajhiz, Iran) و استفاده از کیت سنتز (cDNA synthesis, yektatajhiz, Iran) SYBR Green qPCR با استفاده از (qPCR MasterMix) صورت گرفت. بیان



شکل ۱ - مقایسه میزان هیدروکسی پرولین در گروه‌های مختلف مورد مطالعه (A-C) رنگ آمیزی Masson's Trichrome. برش‌های ۴ میکرونی پارافینی با تریکروم رنگ شده‌اند و زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۲۰۰X مورد بررسی قرار گرفتند. (D) میزان هیدروکسی پرولین ریوی. نتایج بصورت Mean \pm SD نمایش داده شده‌اند. داده‌ها با روش آماری One-Way ANOVA, Tukey multiple comparison test آنالیز شدند. ***P<0.001, ns=non-significant test

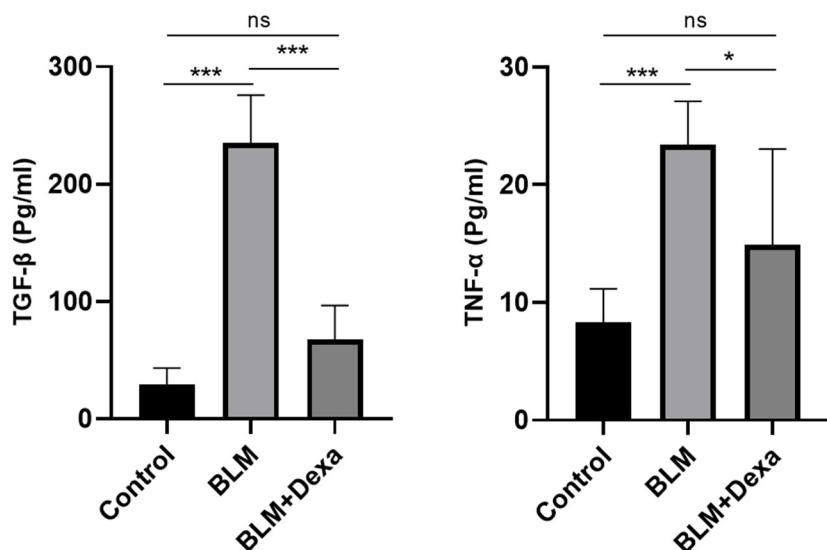
تیمار شده با دگزامتازون، نسبت به گروه کنترل معنی دار نبود ($P > 0.05$). همچنین، کاهش میزان هیدروکسی پرولین در گروه تیمار شده با دگزامتازون نسبت به گروه پرولین در گروه تیمار شده با دگزامتازون (شکل ۱).

تاثیر دگزامتازون بر میزان سایتوکاین‌های TGF- β و TNF- α در بافت ریه: اندازه گیری پروتئین‌های TGF- β و TNF- α در بافت ریه حیوانات مورد مطالعه توسط الیزا صورت گرفت. این سایتوکاین‌ها در ریه موش‌های کنترل به مقدار کمی بیان می‌شود. پس از تلقیح بلئومایسین، میزان این سایتوکاین‌ها در ریه به طور معنی داری افزایش یافت ($P < 0.001$). درمان با دگزامتازون باعث کاهش شدید سطح TNF- β در گروه BLM، نسبت به گروه BLM+DEXA شد ($P < 0.05$) (شکل ۲).

تاثیر دگزامتازون بر بیان نسبی ژن‌های CTGF و ET-1 در بافت ریه: بافت ریه موش‌ها پس از تجویز BLM و درمان با دگزامتازون، در روز ۲۱ جمع آوری و

دگزامتازون شدت فیبروز را کاهش می‌دهد. بررسی‌های بافت شناسی برش‌های ریه‌های رنگ آمیزی شده با ما سون تریکروم از گروه کنترل (دریافت کننده سرم فیزیولوژی به صورت داخل تراشه‌ای)، نشان دهنده ساختار طبیعی ریه شامل عدم رسوب ماتریکس خارج سلولی (بر اساس عدم وجود رنگ آبی در نواحی بینابینی) (Interstitial) و فضای آلوئولی مشخص، بود (شکل A-۱). در حالی که مقاطع بافتی ریه موش‌های گروه BLM، حاکی از تغییرات هیستوتولوژیکی شامل افزایش نواحی فیبروتیک و افزایش رسوب کلاژن (بر اساس افزایش شدت رنگ آبی) و همچنین کاهش فضاهای آلوئولی، نسبت به گروه کنترل بود (شکل B-۱). با این حال، مقاطع بافتی ریه موش‌های تحت درمان با دگزامتازون (گروه BLM+DEXA) تنها فیبروز خفیفی را نشان دادند (شکل C-۱).

نتایج اندازه گیری هیدروکسی پرولین که در آن هیدروکسی پرولین به عنوان شاخصی از حضور کلاژن در نظر گرفته می‌شود، با مشاهدات بافت شناسی سازگار بود. کاهش میزان هیدروکسی پرولین در گروه

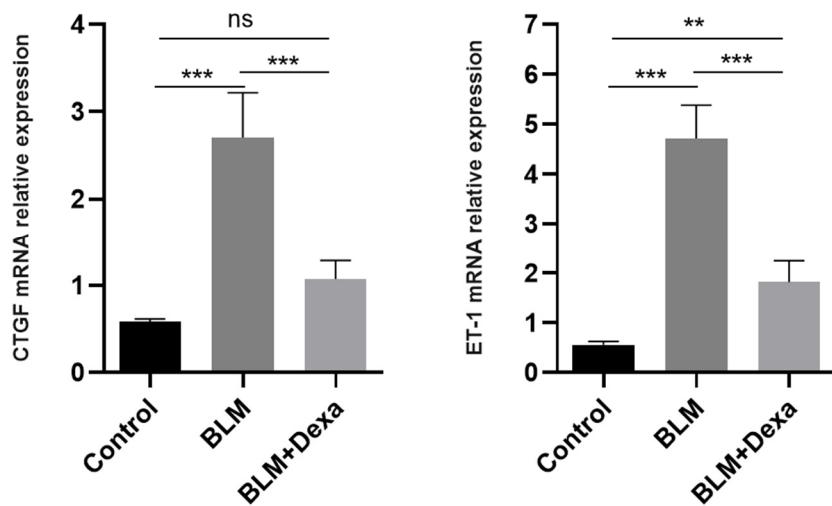


شکل ۲- مقایسه میزان TGF- β و TNF- α بافت ریه در بین گروه‌های مختلف.

ترزیق دگزامتازون میزان سایتوکاین‌های التهابی نظیر TGF- β و TNF- α را در مدل موشی IPF کاهش می‌دهد. داده‌ها با روش آماری One-Way ANOVA, Tukey multiple comparison test آنالیز شدند.

*= $P < 0.05$, ***= $P < 0.001$, ns=non-significant

BLM = Bleomycin, Dexa = Dexamethasone



شکل ۳- مقایسه میزان بیان ژن های CTGF و ET-1 در بین گروه های مطالعه که توسط Real-Time PCR انجام شده است. بیان ژن های CTGF و ET-1 پس از تزریق داروی دگزاماتازون کاهش پیدا کرده است. داده ها با روش آماری One-Way ANOVA, Tukey multiple comparison test آنالیز شدند.
ns= non-significant, *= $P<0.05$, **= $P<0.01$, ***= $P<0.001$
BLM = Bleomycin, Dexa = Dexamethasone,

پیتیال، فعالسازی ماکروفازها می شود. این سلول ها انواع مختلفی از سایتوکاین ها را تولید می کنند که نقش مهمی در آغاز و متعاقباً توسعه التهاب و فیبروز ایفا می کنند. در این فرایند α -TNF افزایش یافته، و به ذذ بال التهاب حاد β -TGF و CTGF نیز در مرحله ترمیم و فیبروز افزایش می یابند (۲۳). نتایج ما یافته های مطالعات دیگر در رابطه با تاثیر بلئومایسین در القا فیبروز را تایید کردند. تلقیح بلئومایسین به صورت داخل تراشه ای باعث ایجاد فیبروز ریه شد که با افزایش میزان رسوب کلژن، افزایش سایتوکاین های β -TGF و α -TNF و افزایش بیان CTGF و ET-1 همراه بود.

مطالعات نشان داده اند که مسدود کردن گیرنده ET-1 در تضعیف فیبروز ریوی القاء شده توسط بلئومایسین موثر خواهد بود (۲۴). مطالعات حیوانی نشان داده که در فیبروز ریوی القاء شده توسط بلئومایسین استفاده از مهار کننده های CTGF مانع از ایجاد فیبرز می شود و حضور CTGF برای ایجاد فیبروز ضروری بوده و می تواند یک هدف بالقوه جهت درمان فیبروز در آینده به

mRNA استخراج شد. سپس سنجش بیان ژن های CTGF و ET-1 با استفاده از روش Real Time-PCR انجام گردید. بیان هر دو ژن در گروه BLM نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری افزایش یافت (۰.۰۰۱< P). درمان با دگزاماتازون باعث کاهش معنی دار بیان ژن های CTGF و ET-1 در گروه BLM+ DEXA نسبت به گروه BLM شد (۰.۰۰۱< P).

بحث

یافته های ما نشان داد تلقیح بلئومایسین به صورت داخل تراشه ای در مدل موشی IPF، منجر به ایجاد نواحی گستردگی فیبروتیک در ریه موش های C57BL/6 می شود. این در حالی است که تیمار با دگزاماتازون باعث تضعیف فیبروز ریوی می شود.

در این مطالعه از مدل فیبروز ریوی ناشی از بلئومایسین استفاده شد، که مبتنی بر التهاب است (۲۸). تلقیح داخل تراشه ای بلئومایسین منجر به القاء التهاب حاد بینابینی و داخل آلوئولار، افزایش آپوپتوز

دگزامتاژون به تاخیر انداخت، نویسنده‌گان این ازمایش پیشنهاد می‌دهند که دگزامتاژون نه تنها التهاب، بلکه آسیب ریه و فعالیت فیبروژنیک را کاهش می‌دهد، و به نقش احتمالی دگزامتاژون در درمان فیبروز اشاره می‌کنند (۳۸).

همسو با این یافته‌ها، نتایج ما اثرات ضد فیبروتیک دگزامتاژون را در مدل موشی IPF، تایید کرد. علاوه بر این در این مطالعه نشان داده شد که دگزامتاژون، حداقل بخشی از تاثیرات ضد فیبروزی خود را به واسطه کاهش TGF- β و احتمالاً مسیرهای وابسته به آن، و همچنین مهار بیان CTGF و ET-1 و به میزان کمتری با تاثیر بر TNF- α اعمال می‌کند.

TGF- β مهمترین سایتوکاین محرك فیبروز است که نقش آن در اکثر مدل های حیوانی و انسانی فیبروز به خوبی مشخص شده است. TGF- β سازوکار های تبدیل فیبروبلاست به میوفیبروبلاست و تولید بیش از حد پروتئین های ماتریکس خارج سلولی را از طریق یک آبشار پیچیده از فاکتور ها و مولکول های پیام رسانی رهبری می کند (۳۹، ۴۰).

مشخص شده است که در روند فیبروز ریوی، افزایش بیان CTGF نسبت به رسوب کلازن تقدم دارد لذا به نظر می رسد که CTGF مسئول رسوب کلازن است که به طور کلی به TGF- β نسبت داده می شود (۴۰). شواهد و یافته‌های این مطالعه در مجموع کاهش میزان رسوب کلازن در ریه موش‌های تیمار شده با دگزامتاژون را توجیه کرده و پیشنهاد می‌دهند که دگزامتاژون TGF- β و CTGF افزایش یافته را تحت تاثیر قرار داده و مانع از تولید فزاینده ماتریکس خارج سلولی می شود. برخلاف نتایج ما، در مطالعه ای گزارش شده است که دگزامتاژون هیچ اثر کلی بر فیبروز ناشی از TGF- β ۱ نداشته است (۴۱). علاوه بر این، دگزامتاژون با مهار بیان ET-1 نیز قادر است تمایز فیبروبلاست ها و تولید کلازن در ریه این موش ها را کاهش دهد. همچنین تاثیر خفیف تر دگزامتاژون بر TNF- α می تواند به دلیل تعامل آن، به عنوان یک ضدالتهاب وسیع الطیف با خواص ضد فیبروزی احتمالی سلول های ایمنی باشد.

شمار رود (۲۹). همچنین، در مدل های موشی تزریق آنتی بادی های ضد TNF- α باعث کاهش التهاب ریوی و فیبروز ناشی از BLM شد. متأسفانه، در یک کارآزمایی فاز دوم، استفاده از Etanercept (گیرنده TNF- α نوترکیب انسانی که به TNF- α متصل می شود و آن را غیرفعال می کند) بهبود قابل توجهی را در بیماران تحت درمان نشان نداد (۳۳).

از آنجا که IPF در درجه اول یک بیماری التهابی محسوب می شد، سرکوب سیستم ایمنی گستردگی عنوان یک درمان بالقوه در نظر گرفته می شود (۳۰). در مطالعه Brenner و همکاران نشان داده شد که درمان با دگزامتاژون سنتز کلازن را توسط فیبروبلاست های ریه جنین انسان مهار نمی کند، بلکه باعث تحریک سنتز کلازن می شود (۳۱). دگزامتاژون ممکن است فعالیت تکثیری فیبروبلاست ها را به طور مستقیم تحت تأثیر قرار دهد. گزارش شده است که دگزامتاژون تکثیر فیبروبلاست های ریه موش را در شرایط آزمایشگاهی تحریک می کند (۳۲). همچنین در یک مطالعه نشان داده شده است که درمان با دگزامتاژون با وجود کاهش آشکار التهاب، تکثیر فیبروبلاست را کاهش نمی دهد (۳۳). با این وجود، آزمایش های In-vitro نشان داده‌اند که دگزامتاژون قادر به کاهش سنتز کلازن توسط فیبروبلاست ها است (۳۴). همچنین نشان داده شده است که درمان با دگزامتاژون، باعث کاهش سنتز کلازن کل بدن در نوزادان مبتلا به بیماری مزمن ریوی^۱ می شود (۳۵).

علاوه بر موارد ذکر شده، مطالعات پیشین نشان داده اند که دگزامتاژون به واسطه القاء مرگ سلولی برنامه ریزی شده در سلول های التهابی، کاهش التهاب آلوئولی و کاهش پیام رسانی TGF- β ، باعث کاهش فیبروز ریوی ناشی از بلئومایسین در موش صحرایی و موش های CD-1 می شود (۳۶، ۳۷). در مطالعه Chen و همکاران، درمان با دگزامتاژون وسعت فیبروز را با کاهش شدید التهاب، آسیب ریه و فعالیت فیبروژنیک کاهش داد. این نتایج نشان داد که پیشرفت فیبروز ریوی القا شده تو سط بلئومایسین در موش ها را می توان با استفاده از

chronic lung disease^۱

Investig Drugs. 2014;23(7):893-910.

6. Crystal RG, Bitterman PB, Rennard SI, Hance AJ, Keogh BA. Interstitial lung diseases of unknown cause. Disorders characterized by chronic inflammation of the lower respiratory tract (first of two parts). N Engl J Med. 1984;310(3):154-66.

7. Katzenstein AL, Myers JL. Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. Am J Respir Crit Care Med. 1998;157(4 Pt 1):1301-15.

8. Ryu JH, Colby TV, Hartman TE. Idiopathic pulmonary fibrosis: current concepts. Mayo Clin Proc. 1998;73(11):1085-101.

9. Wynn TA. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. J Exp Med. 2011;208(7):1339-1350.

10. Balestro E, Calabrese F, Turato G, Lunardi F, Bazzan E, Marulli G, et al. Immune inflammation and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis. PloS One. 2016;11(5).

11. Richeldi L, Davies HRH, Spagnolo P, Luppi F, Group CA. Corticosteroids for idiopathic pulmonary fibrosis. Cochrane Database Syst Rev. 1996;2010(2).

12. Network IPFCR. Prednisone, azathioprine, and N-acetylcysteine for pulmonary fibrosis. N Engl J Med. 2012;366(21):1968-1977.

13. Fernandez IE, Eickelberg O. The impact of TGF- β on lung fibrosis: from targeting to biomarkers. Proceed Am Thorac Soc. 2012;9(3):111-116.

14. Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- β : the master regulator of fibrosis. Nat Rev Nephrol. 2016;12(6):325.

15. Ozawa Y, Suda T, Naito T, Enomoto N, Hashimoto D, Fujisawa T, et al. Cumulative incidence of and predictive factors for lung cancer in IPF. Respirology. 2009;14(5):723-8.

16. Datta A, Scotton CJ, Chambers RC. Novel therapeutic approaches for pulmonary fibrosis. Br J Pharmacol. 2011;163(1):141-72.

17. Ponticos M, Holmes AM, Shi-Wen X, Leoni P, Khan K, Rajkumar VS, et al. Pivotal role of connective tissue growth factor in lung fibrosis: MAPK-dependent transcriptional activation of type I collagen. Arthritis Rheum. 2009;60(7):2142-2155.

18. Murray LA, Argentieri RL, Farrell FX, Bracht M, Sheng H, Whitaker B, et al. Hyper-responsiveness of IPF/UIP fibroblasts: interplay between TGFbeta1, IL-13 and CCL2. Int J Biochem Cell Biol. 2008;40(10):2174-82.

19. Ponticos M, Holmes AM, Shi-wen X, Leoni P, Khan K, Rajkumar VS, et al. Pivotal role of connective tissue growth factor in lung fibrosis: MAPK-dependent transcriptional activation of type I collagen. Arthritis Rheum. 2009;60(7):2142-55.

20. Shi-wen X, Kennedy L, Renzoni EA, Bou-Gharios G, du Bois RM, Black CM, et al. Endothelin

ماکروفاز مهمترین سلول تولید کننده TNF- α , به دو گروه پیش التهابی (M1) و ضد التهابی (M2) تقسیم می شود و می تواند به ترتیب، در جهت توسعه فیبروز یا مهار آن عمل کند (۴۲، ۴۳). مولکول های ضدالتهابی وسیع الطیف می توانند با هر دو نوع تداخل کنند. تداخل داروهای ضدالتهاب (نظیر anti-TNF- α و anti-ET-1) با خواص ضد فیبروزی سلول های ایمنی، یکی از دلایل شکست این داروها در کارآزمایی های بالینی می باشد (۴۴).

نتیجه گیری

به طور خلاصه، مطالعه حاضر تایید کرد که دگزاماتازون باعث تخفیف فیبروز در مدل فیبرز موشی IPF القاء شده با بلکومایسین می شود، و کاهش چشمگیر میزان TGF- β و بیان CTGF و ET-1 می تواند از مکانیسم های ضد فیبروتیک احتمالی این دارو باشد.

تقدیر و تشکر

بودجه این مطالعه تو سط معاونت پژوهشی دادشگاه علوم پزشکی ایران با کد ۹۶۰۴۳۰۳۲۴۷۳ تامین گردیده است.

References

- Rafii R, Juarez MM, Albertson TE, Chan AL. A review of current and novel therapies for idiopathic pulmonary fibrosis. J Thorac Dis. 2013;5(1):48.
- Barratt SL, Creamer A, Hayton C, Chaudhuri N. Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF): an overview. J Clin Med. 2018;7(8):201.
- Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. Am J Respir Crit Care Med. 2011;183(6):788-824.
- Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. Ann Intern Med. 2001;134(2):136-151.
- Chakraborty S, Chopra P, Ambi SV, Dastidar SG, Ray A. Emerging therapeutic interventions for idiopathic pulmonary fibrosis. Expert Opin

- is a downstream mediator of profibrotic responses to transforming growth factor β in human lung fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2007;56(12):4189-4194.
21. Uguccioni M, Pulsatelli L, Grigolo B, Facchini A, Fasano L, Cinti C, et al. Endothelin-1 in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Pathol.* 1995;48(4):330-334.
 22. Park SH, Saleh D, Giaid A, Michel RP. Increased endothelin-1 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis and the effect of an endothelin receptor antagonist. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156(2):600-608.
 23. Della Latta V, Cecchettini A, Del Ry S, Morales MA. Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: From biological mechanisms to counteractions. *Pharmacol Res.* 2015;97:122-130.
 24. Richeldi L, Davies HRH, Spagnolo P, Luppi F. Corticosteroids for idiopathic pulmonary fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003;3.
 25. Langenbach SY, Wheaton BJ, Fernandes DJ, Jones C, Sutherland TE, Wraith BC, et al. Resistance of fibrogenic responses to glucocorticoid and 2-methoxyestradiol in bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *Can J Physiol Pharmacol.* 2007;85(7):727-38.
 26. Li HP, Li X, He GJ, Yi XH, Kaplan AP. The influence of dexamethasone on the proliferation and apoptosis of pulmonary inflammatory cells in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Respirology.* 2004;9(1):25-32.
 27. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods.* 2001;25(4):402-408.
 28. Tashiro J, Rubio GA, Limper AH, Williams K, Elliot SJ, Ninou I, et al. Exploring animal models that resemble idiopathic pulmonary fibrosis. *Front Med.* 2017;4:118.
 29. Leask A. CCN2: a bona fide target for anti-fibrotic drug intervention. *J Cell Commun Signal.* 2011;5(2):131-133.
 30. White ES, Lazar MH, Thannickal VJ. Pathogenetic mechanisms in usual interstitial pneumonia/idiopathic pulmonary fibrosis. *J Pathol.* 2003;201(3):343-354.
 31. Brenner R, Felger D, Winter C, Christiansen A, Hofmann D, Bartmann P. Effects of dexamethasone on proliferation, chemotaxis, collagen I, and fibronectin-metabolism of human fetal lung fibroblasts. *Pediatr Pulmonol.* 2001;32(1):1-7.
 32. Warshamana GS, Martinez S, Lasky JA, Corti M, Brody AR. Dexamethasone activates expression of the PDGF- α receptor and induces lung fibroblast proliferation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1998;274(4):L499-L507.
 33. Dik W, Versnel M, Naber B, Janssen D, Van Kaam A, Zimmermann L. Dexamethasone treatment does not inhibit fibroproliferation in chronic lung disease of prematurity. *Eur Respir J.* 2003;21(5):842-847.
 34. Sterling Jr KM, Harris MJ, Mitchell JJ, DiPetrillo TA, Delaney GL, Cutroneo KR. Dexamethasone decreases the amounts of type I procollagen mRNAs in vivo and in fibroblast cell cultures. *J Biol Chem.* 1983;258(12):7644-7647.
 35. Co E, Chari G, McCulloch K, Vidyasagar D. Dexamethasone treatment suppresses collagen synthesis in infants with bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulmonol.* 1993;16(1):36-40.
 36. Shi K, Jiang J, Ma T, Xie J, Duan L, Chen R, et al. Dexamethasone attenuates bleomycin-induced lung fibrosis in mice through TGF- β , Smad3 and JAK-STAT pathway. *Int J Clin Exp Med.* 2014;7(9):2645.
 37. Li Hp, Li X, He GJ, Yi XH, Kaplan AP. The influence of dexamethasone on the proliferation and apoptosis of pulmonary inflammatory cells in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Respirology.* 2004;9(1):25-32.
 38. Chen F, Gong L, Zhang L, Wang H, Qi X, Wu X, et al. Short courses of low dose dexamethasone delay bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *Eur J Pharmacol.* 2006;536(3):287-295.
 39. Rosenbloom J, Castro SV, Jimenez SA. Narrative review: fibrotic diseases: cellular and molecular mechanisms and novel therapies. *Ann Intern Med.* 2010;152(3):159-166.
 40. Lasky JA, Ortiz LA, Tonthat B, Hoyle GW, Corti M, Athas G, et al. Connective tissue growth factor mRNA expression is upregulated in bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1998;275(2):L365-L371.
 41. Porte J, Jenkins G. Assessment of the effect of potential antifibrotic compounds on total and $\alpha V\beta 6$ integrin-mediated TGF- β activation. *Pharmacol Res Perspect.* 2014;2(4):e00030.
 42. Braga TT, Agudelo JSH, Camara NOS. Macrophages during the fibrotic process: M2 as friend and foe. *Front Immunol.* 2015;6:602.
 43. Hou J, Shi J, Chen L, Lv Z, Chen X, Cao H, et al. M2 macrophages promote myofibroblast differentiation of LR-MSCs and are associated with pulmonary fibrogenesis. *Cell Commun Signal.* 2018;16(1):1-14.
 44. Heukels P, Moor C, von der Thüsen J, Wijsenbeek M, Kool M. Inflammation and immunity in IPF pathogenesis and treatment. *Respir Med.* 2019;147:79-91.