



## بررسی اثر دگزامتازون بر سایتوکاین‌ها و بیان ژن‌ها منتخب دخیل در فیروز: مطالعه در مدل موشی فیروز روی ایدیوپاتیک

**صابر مهدی زاده:** گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران، و مرکز تحقیقات ایمنولوژی و عفونت‌های میکروبی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران  
**مرجان طاهریان:** گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران، و مرکز تحقیقات ایمنولوژی 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 ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران، و مرکز تحقیقات ایمنولوژی و عفونت‌های میکروبی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران  
**پریا بیاتی:** گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران، و مرکز تحقیقات ایمنولوژی و عفونت‌های میکروبی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران  
**علی انیسیان:** گروه پاتولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر، اهر، ایران

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

### چکیده

#### کلیدواژه‌ها

بلئومایسین،  
فیروز روی ایدیوپاتیک،  
CTGF،  
ET-1،  
TNF- $\alpha$ ،  
TGF- $\beta$   
دگزامتازون

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۱۷

تاریخ چاپ: ۱۴۰۲/۰۶/۱۸

**زمینه و هدف:** فیروز روی ایدیوپاتیک (Idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)، یک بیماری التهابی مزمن، پیشرونده ریه و عمدتاً 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 گلوکوکورتیکوئیدهایی نظیر دگزامتازون (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 کارایی آنها همچنان مورد بحث می‌باشد. در این مطالعه بررسی تاثیر داروی دگزامتازون در مدل IPF انجام گردید.

**روش کار:** تیمار با دگزامتازون در مدل موشی فیروز روی القاء شده توسط تلقیح داخل تراشه‌ای بلئومایسین انجام شد. فیروز ایجاد شده از طریق سنسج‌های هیستوپاتولوژیکی و اندازه گیری هیدروکسی پرولین در بافت ریه صورت گرفت. سنسج میزان سایتوکاین‌های TGF- $\beta$  و TNF- $\alpha$  به روش الیزا و بیان ژن‌های CTGF و ET-1 از طریق RT-PCR انجام شد.

**یافته‌ها:** نتایج حاکی از ایجاد فیروز و افزایش رسوب کلاژن، و افزایش معنی دار پروتئین‌های TGF- $\beta$  و TNF- $\alpha$  و بیان ژن‌های CTGF و ET-1 در بافت ریه، به دنبال تلقیح بلئومایسین بود. تیمار با دگزامتازون باعث کاهش میزان رسوب کلاژن، سطوح TGF- $\beta$  و TNF- $\alpha$  ( $P < 0.05$ ) و کاهش بیان افزایش یافته ژنهای CTGF و ET-1 ( $P < 0.001$ ) در موش‌های درگیر فیروز ریه شد.

**نتیجه گیری:** در این مطالعه نشان داده شد که دگزامتازون از طریق کاهش چشمگیر میزان TGF- $\beta$  و بیان CTGF و ET-1، باعث تخفیف فیروز روی القاء شده توسط بلئومایسین می‌شود.

**تعارض منافع:** گزارش نشده است.

**منبع حمایت کننده:** حامی مالی ندارد.

شیوه استناد به این مقاله:

Mehdizadeh S, Taherian M, Mousavizadeh K, Pashangzadeh S, Bayati P, Anissian A, Mojtavavi 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 3.0 CC BY-NC-SA 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 Mojtavavi:** 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) mojtavavi.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  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). The definitive treatment for patients has not yet been approved. Although, 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- $\beta$ , 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- $\beta$  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- $\beta$  fibrogenic responses in fibroblasts, which produces an extracellular matrix and differentiates fibroblasts into myofibroblasts. Also, the expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), 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- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , 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- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , 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  $\mu$ 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- $\beta$  and TNF- $\alpha$ , 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- $\beta$  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- $\alpha$  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- $\alpha$  and TGF- $\beta$  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- $\beta$ . Further, Dexamethasone treatment of Bleomycine received mice significantly reduced the expression of CTGF gene ( $P < 0.001$ ). CTGF expression occurs before the TGF- $\beta$  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 Dexamethason 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- $\beta$  and TNF- $\alpha$ , 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, Mojtavavi 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

فیبروز ریوی ایدیوپاتیکی (Idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)، یک بیماری التهابی مزمن و پیشرونده است که با تکثیر فیبروبلاست‌ها و رسوب اجزای ماتریکس خارج سلولی در ریه مشخص می‌شود (۱، ۲). IPF شایع‌ترین فرم فیبروز ریوی و عمدتاً کشنده است و متوسط بقای بیماران ۲ تا ۳ سال می‌باشد (۳). تاکنون درمان قطعی برای این بیماران به تایید نرسیده است. استراتژی‌های درمانی پیشنهاد شده برای این بیماری شامل کورتیکواستروئیدها و سایر سرکوب‌کننده‌های سیستم ایمنی، ترکیبات سیتوتوکسیک، و همچنین ترکیبات ضد فیبروزی می‌باشد (۴، ۵).

اگرچه علت دقیق IPF ناشناخته است، اما از مدت‌ها پیش فرآیند التهاب مزمن در ریه مکانیسم اصلی این بیماری در نظر گرفته شده است (۸-۶). هر چند اخیراً پاتوژنز IPF در درجه اول یک فرآیند فیبروتیک محسوب می‌شود که در آن آسیب‌های مکرر به اپیتلیال آلوئول، همراه با پاسخ‌های خارج از تنظیم در ترمیم اپیتلیال آسیب دیده و اختلال عملکرد فیبروبلاست‌ها منجر به تغییر شکل مداوم بافت و فیبروز، به عنوان مرحله نهایی بیماری شده و از ساز و کارهای دخیل در IPF می‌باشند (۹). با این حال، شواهد نشان داده‌اند که التهاب یکی از عوامل نقش آفرین در ایجاد و پاتوژنز IPF می‌باشد (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 تعدیل‌کننده التهاب، در آزمایش‌های 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،  $TGF-\beta$ ، سایتوکاین کلیدی و تنظیم‌کننده فیبروز، باعث پیشبرد التهاب و افزایش فعالیت و تکثیر فیبروبلاست‌ها در محل التهاب، تمایز به میوفیبروبلاست‌ها و تولید ماتریکس خارج سلولی شده و منجر به فیبروز ریوی شدید می‌گردد (۱۳، ۱۴). بنابراین مهار این سایتوکاین یک درمان بالقوه در درمان IPF می‌باشد. اما از آنجا که مهار مستقیم این سایتوکاین پلوتروپیک می‌تواند عوارض جانبی بسیار نامطلوبی، از جمله ابتلا به سرطان ریه در بیماران IPF را در پی داشته باشد (۱۵، ۱۶)، لذا درمان‌هایی که اثرات  $TGF-$

$\beta$  را کاهش داده یا عوامل موثر در پایین دست آن را هدف قرار می‌دهند، اخیراً مورد توجه قرار گرفته‌اند. فاکتور رشد بافت همبند (Connective tissue growth factor, CTGF)، به عنوان یک واسطه پایین دست، توسط  $TGF-\beta$  القاء شده و اثرات فیبروتیک آن را پیش می‌برد و باعث تقویت فیبروز ریوی بواسطه تکثیر فیبروبلاست و رسوب کلژن می‌شود (۱۷). شواهد نشان داده‌اند که بیان CTGF در فیبروبلاست‌های مبتلایان به IPF و همچنین در موش‌های تیمار شده با بلئومایسین تشدید می‌شود (۱۸، ۱۹). علاوه بر این، اندوتلین-۱ (Endothelin-1, ET-1) یک واسطه پایین دست پاسخ‌های فیبروزیک  $TGF-\beta$  در فیبروبلاست‌ها است که باعث تولید ماتریکس خارج سلولی و تمایز فیبروبلاست به میوفیبروبلاست می‌شود (۲۰). در بیماران مبتلا به IPF و مدل فیبروز ریوی ناشی از بلئومایسین در رت بیان ET-1 افزایش می‌یابد (۲۱، ۲۲). همچنین، بیان فاکتور نکروز تومور آلفا ( $TNF-\alpha$ )، که علاوه بر خاصیت التهابی، ویژگی‌های فیبروزیک نیز داراست، در ریه بیماران مبتلا IPF افزایش زیادی دارد و این بیان، با افزایش فیبروبلاست‌ها و رسوب پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی در ناحیه بینابینی ریه مرتبط می‌باشد (۲۳). به طور کلی این یافته‌ها نشان می‌دهند که عوامل ذکر شده اهداف مناسبی جهت طراحی استراتژی‌های درمانی و یا بررسی اثر داروهای پیشنهادی در درمان IPF می‌باشند.

کورتیکواستروئیدها، عوامل ضد التهابی هستند که با سرکوب ایمنی سلولی و هومورال، میزان مولکول‌های پیش التهابی را کاهش می‌دهند. با توجه به عملکرد سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی و نقش التهاب در شروع و تداوم پاتوبیولوژی IPF، کورتیکواستروئیدها، در درمان این بیماری مطرح می‌باشند (۲۳). دگزامتازون، یکی از قوی‌ترین داروهای گلوکوکورتیکوئیدی می‌باشد، اما علی‌رغم مطالعاتی که تا کنون در خصوص تاثیر آن در مهار فیبروز ریوی صورت گرفته است، اثرات ضد فیبروزی آن همچنان مورد بحث بوده و یافته‌های ضد و نقیضی در این باره وجود دارد (۲۴-۲۶). همچنین مکانیسم اثر آن در IPF به طور کامل مشخص نشده است. لذا در این مطالعه ضمن تایید اثر درمانی دگزامتازون بر فیبروز ریوی، تاثیر آن بر فاکتورهای

۲۱، تحت بیهوشی عمیق معدوم شدند 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 جهت 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 الیزا و سنجش هیدروکسی پرولین تقسیم گردید و در  $80^{\circ}\text{C}$  نگهداری شد.

**بررسی‌های پاتولوژیک:** ریه سمت چپ موش‌ها پس از ۲۴ ساعت غوطه‌وری در فرمالین و تولید بلوک‌های پارافینی توسط دستگاه میکروتوم برش داده شدند و برش‌های  $4\ \mu\text{m}$  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 تریکروم بافت موسسه تحقیقاتی و تولیدی شیمی پژوهش آسیا، مطابق با دستورالعمل انجام گردید. کلاژن بافت‌های رنگ آمیزی شده با رنگ ماسون تریکروم در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شد. در این رنگ آمیزی کلاژن 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 کلاژن بود.

**روش اندازه‌گیری هیدروکسی پرولین در بافت ریه:** بافت‌های ریه فریز شده، توسط  $\text{HCl}$  ۶ مولار و دمای  $110^{\circ}\text{C}$  هضم شدند. سپس، مایع رویی به چاهک‌های پلیت الیزا 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 سنجی توسط دستگاه الیزا ریدر با طول موج ۵۷۰ نانومتر صورت گرفت و غلظت هیدروکسی پرولین محاسبه شد.

**الیزا:** به منظور بررسی تاثیر دگزامتازون بر میزان سایتوکاین‌های  $\text{TGF-}\beta$  و  $\text{TNF-}\alpha$  موجود در بافت ریه، پس از کوبیدن و خرد کردن بافت در هاون به همراه

پرو فیبروتیک مانند  $\text{TGF-}\beta$ ،  $\text{TNF-}\alpha$ ،  $\text{CTGF}$  و  $\text{ET-1}$  بررسی گردید.

## روش کار

**حیوانات و گروه‌های مورد مطالعه:** موش‌های ۸-۶ 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 دگزامتازون (BLM+DEXA)، تزریق بلئومایسین در روز یک و درمان با دگزامتازون از روز یک تا روز ۱۴ به صورت روزانه

**روش القاء مدل فیبروز ریوی ناشناخته (IPF) در موش‌ها و مداخله با دگزامتازون:** موش‌های نر ۶ تا ۸ هفته‌ای خریداری شده در مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی ایران "Center of 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 هفته‌بطور 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 القا فیبروز، موش‌ها تحت بیهوشی  $50\ \mu\text{L}$  سرم فیزیولوژی یا بلئومایسین ( $5\text{mg/kg}$ ) را به صورت تک دوز توسط سرنگ گاوژ ظریف داخل تراشه دریافت کردند.

**مداخله با دگزامتازون:** دگزامتازون ( $1\text{mg/kg/day}$ ) روزانه از روز یک به مدت ۱۴ روز داخل صفاقی در شرایط استریل به موش‌ها تزریق شد. موش‌ها در روز

نسبی mRNA ژن‌ها با استفاده از روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (فرمولی که به منظور محاسبه بیان نسبی mRNA ژن در نمونه‌ها هنگام انجام qRT-PCR استفاده می‌شود) ارزیابی (۲۷) و با استفاده از سطح بیان mRNA ژن GUSB (Housekeeping genes) نرمال شد.

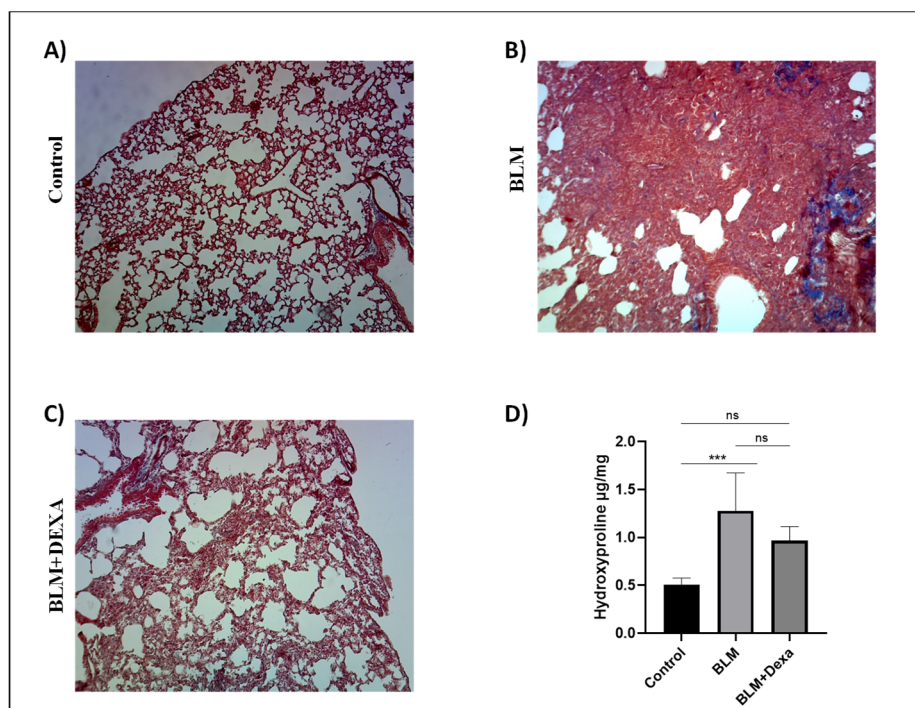
**آنالیز آماری داده‌ها:** آنالیز یافته‌های گروه‌های مختلف مورد مطالعه با نرم افزار Prism نسخه ۸٫۱ و با استفاده از آزمون آماری One way ANOVA و Tukey multiple comparison test انجام گردید.

### یافته‌ها

**ارزیابی میزان فیبروز در مدل موشی فیبروز ریوی و تاثیر مداخلة با دگزامتازون:** 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  $TGF-\beta$  طبق دستورالعمل کیت (DY1679-05 R&D) و  $TNF-\alpha$  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 RNX- Plus (Sinaclon, Iran) هموژنیزه شدند و طبق دستورالعمل (RNX- Plus, Sinaclon, Iran) از بافت هموژنیزه شده استخراج و cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (cDNA synthesis, yektatajhez, Iran) تولید شد و واکنش qRT-PCR با استفاده از SYBR Green qPCR MasterMix (yektatajhez, Iran) 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 200X 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.  $***=P<.001$ , ns=non-significant**

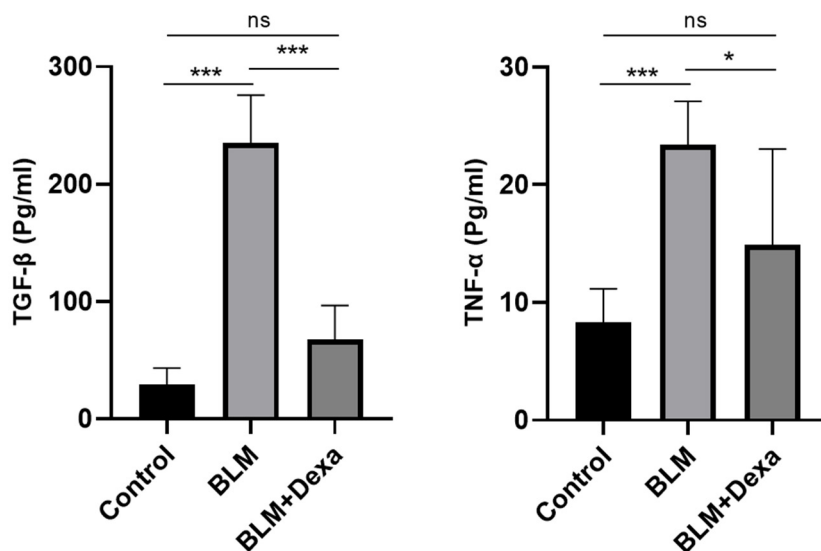
تیمار شده با دگزامتازون، نسبت به گروه کنترل معنی دار نبود ( $P > 0.05$ ). همچنین، کاهش میزان هیدروکسی پرولین در گروه تیمار شده با دگزامتازون نسبت به گروه BLM، به لحاظ آماری معنی دار نبود (شکل ۱- D).

**تاثیر دگزامتازون بر میزان سایتوکاین‌های  $TGF-\beta$  و  $TNF-\alpha$  در بافت ریه:** اندازه گیری پروتئین های  $TGF-\beta$  و  $TNF-\alpha$  در بافت ریه حیوانات مورد مطالعه توسط الایزا 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  $TGF-\beta$  در گروه BLM+ DEXA، نسبت به گروه BLM شد ( $P < 0.001$ ). تاثیر دگزامتازون در کاهش بیان  $TNF-\alpha$  در این گروه کمتر، اما به لحاظ آماری معنی دار، بود ( $P < 0.05$ ) (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 جمع‌آوری و

دگزامتازون شدت فیبروز را کاهش می‌دهد. بررسی‌های بافت‌شناسی 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 آلئولی مشخص، بود (شکل ۱- A). در حالی که مقاطع بافتی ریه موش‌های گروه BLM، حاکی از تغییرات هیستوپاتولوژیکی شامل افزایش نواحی فیبروتیک و افزایش رسوب کلاژن (بر اساس افزایش شدت رنگ آبی) و همچنین کاهش فضاهای آلئولی، نسبت به گروه کنترل بود (شکل ۱- B). با این حال، مقاطع بافتی ریه موش‌های تحت درمان با دگزامتازون (گروه BLM+DEXA) تنها فیبروز خفیفی را نشان دادند (شکل ۱- C).

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

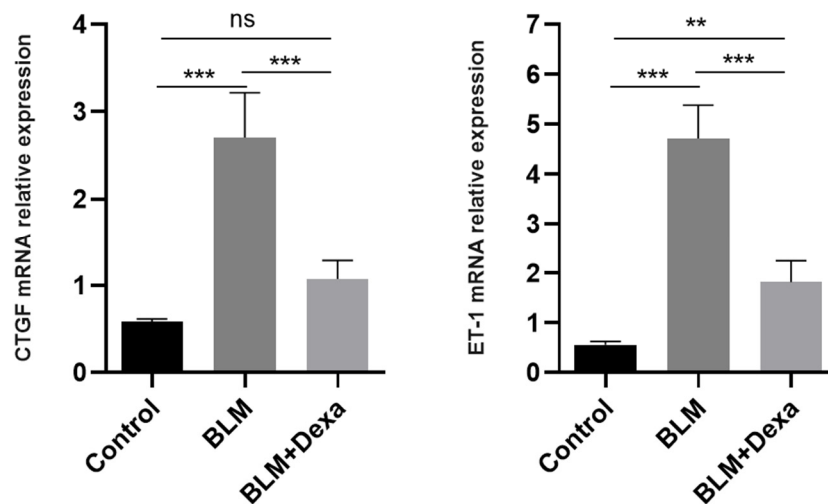


شکل ۲- مقایسه میزان  $TGF-\beta$  و  $TNF-\alpha$  بافت ریه در بین گروه‌های مختلف.

تزریق دگزامتازون میزان سایتوکاین‌های التهابی نظیر  $TGF-\beta$  و  $TNF-\alpha$  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 ژن‌های CTGF و ET-1 در بین گروه‌های مطالعه که توسط Real-Time PCR انجام شده است. بیان ژن‌های CTGF و ET-1 پس از تزریق داروی دگزامتازون کاهش پیدا کرده است. داده‌ها 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,

اپیتلیال، فعالسازی ماکروفاژها می‌شود. این سلول‌ها انواع مختلفی از سایتوکاین‌ها را تولید می‌کنند که نقش مهمی در آغاز و متعاقباً توسعه التهاب و فیبروز ایفا می‌کنند. در این فرایند TNF- $\alpha$  افزایش یافته، و به دنبال التهاب حاد TGF- $\beta$  و CTGF نیز در مرحله ترمیم و فیبروز افزایش می‌یابند (۲۳). نتایج ما یافته‌های مطالعات دیگر در رابطه با تاثیر بلئومایسین در القا فیبروز را تایید کردند. تلقیح بلئومایسین به صورت داخل تراشه‌ای باعث ایجاد فیبروز ریه شد که با افزایش میزان رسوب کلاژن، افزایش سایتوکاین‌های TGF- $\beta$  و TNF- $\alpha$  و افزایش بیان CTGF و ET-1 همراه بود. مطالعات نشان داده‌اند که مسدود کردن گیرنده ET-1 در تضعیف فیبروز ریوی القاء شده توسط بلئومایسین موثر خواهد بود (۲۲). مطالعات حیوانی نشان داده که در فیبروز ریوی القاء شده توسط بلئومایسین استفاده از مهارکننده‌های CTGF مانع از ایجاد فیبروز می‌شود و حضور CTGF برای ایجاد فیبروز ضروری بوده و می‌تواند یک هدف بالقوه جهت درمان فیبروز در آینده به

mRNA استخراج شد. سپس سنجش بیان ژن‌های 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 معنی‌داری افزایش یافت ( $P < 0.001$ ). درمان با دگزامتازون باعث کاهش معنی‌دار بیان ژن‌های CTGF و ET-1 در گروه BLM+DEXA نسبت به گروه BLM شد ( $P < 0.001$ ).

### بحث

یافته‌های ما نشان داد تلقیح بلئومایسین به صورت داخل تراشه‌ای در مدل موشی IPF، منجر به ایجاد نواحی گسترده فیبروتیک در ریه موش‌های C57BL/6 می‌شود. این در حالی است که تیمار با دگزامتازون باعث تضعیف فیبروز ریوی می‌شود.

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

دگزامتازون به تاخیر انداخت، نویسنندگان این آزمایش پیشنهاد می دهند که دگزامتازون نه تنها التهاب، بلکه آسیب ریه و فعالیت فیبروزنیک را کاهش می دهد، و به نقش احتمالی دگزامتازون در در مان فیبروز اشاره می کنند (۳۸).

همسو با این یافته‌ها، نتایج ما اثرات ضد فیبروتیک دگزامتازون را در مدل موشی IPF، تایید کرد. علاوه بر این در این مطالعه نشان داده شد که دگزامتازون، حداقل بخشی از تاثیرات ضد فیبروزی خود را به واسطه کاهش  $TGF-\beta$  و احتمالاً مسیریهای وابسته به آن، و همچنین مهار بیان CTGF و ET-1 و به میزان کمتری با تاثیر بر  $TNF-\alpha$  اعمال می کند.

$TGF-\beta$  مهمترین سایتوکاین محرک فیبروز است که نقش آن در اکثر مدل های حیوانی و انسانی فیبروز به خوبی مشخص شده است.  $TGF-\beta$  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 (۱۴، ۳۹).

مشخص شده است که در روند فیبروز ریوی، افزایش بیان CTGF نسبت به رسوب کلاژن تقدم دارد لذا به نظر می رسد که CTGF مسئول رسوب کلاژن است که به طور کلی به  $TGF-\beta$  نسبت داده می شود (۴۰). شواهد و یافته‌های این مطالعه در مجموع کاهش میزان رسوب کلاژن در ریه موش‌های تیمار شده با دگزامتازون را توجیه کرده و پیشنهاد می دهند که دگزامتازون  $TGF-\beta$  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 دگزامتازون هیچ اثر کلی بر فیبروز ناشی از  $TGF-\beta 1$  نداشته است (۴۱). علاوه بر این، دگزامتازون با مهار بیان ET-1 نیز قادر است تمایز فیبروبلاست ها و تولید کلاژن در ریه موش ها را کاهش دهد. همچنین تاثیر خفیف تر دگزامتازون بر  $TNF-\alpha$  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  $TNF-\alpha$  باعث کاهش التهاب ریوی و فیبروز ناشی از BLM شد. متأسفانه، در یک کارآزمایی فاز دوم، استفاده از Etanercept (گیرنده  $TNF-\alpha$  نوترکیب انسانی که به  $TNF-\alpha$  متصل می شود و آن را غیرفعال می کند) بهبود قابل توجهی را در بیماران تحت درمان نشان نداد (۲۳).

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

علاوه بر موارد ذکر شده، مطالعات پیشین نشان داده اند که دگزامتازون به واسطه القاء مرگ سلولی برنامه ریزی شده در سلول های التهابی، کاهش التهاب آلئولی و کاهش پیام رسانی  $TGF-\beta$ ، باعث کاهش فیبروز ریوی ناشی از بلئومایسین در موش صحرايي و موش های CD-1 می شود (۳۶، ۳۷). در مطالعه Chen و همکاران، درمان با دگزامتازون وسعت فیبروز را با کاهش شدید التهاب، آسیب ریه و فعالیت فیبروزنیک کاهش داد. این نتایج نشان داد که پیشرفت فیبروز ریوی القا شده توسط بلئومایسین در موش‌ها را می توان با استفاده از

<sup>1</sup> chronic lung disease

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- $\beta$  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- $\beta$ : 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 TGF $\beta$ 1, 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

ماکروفاژ مهمترین سلول تولید کننده TNF- $\alpha$ ، 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 ضد التهابی وسیع الطیف می توانند با هر دو نوع تداخل کنند. تداخل داروهای ضد التهاب (نظیر anti-TNF- $\alpha$  و prednisone) 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 دگرآمنازون باعث تخفیف فیبروز در مدل فیبروز موشی IPF القاء شده با بلئومایسین می شود، و کاهش چشمگیر میزان TGF- $\beta$  و بیان ET-1 و CTGF می تواند از مکانیسم های ضد فیبروتیک احتمالی این دارو باشد.

### تقدیر و تشکر

بودجه این مطالعه توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران با کد ۹۶۰۴۳۰۳۲۴۷۳ تامین گردیده است.

### References

1. Raffi 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.
2. Barratt SL, Creamer A, Hayton C, Chaudhuri N. Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF): an overview. *J Clin Med*. 2018;7(8):201.
3. 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.
4. 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.
5. 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  $\beta$  in human lung fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2007;56(12):4189-4194.

21. Ugucioni 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, Cecchetti 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- $\alpha$  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- $\beta$ , 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- $\beta$  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.