

Metagenomic Analysis of the Lung Microbiome in Chemically Injured and Healthy Individuals

Mahyar Sharif Bagheri¹, Ali Qazvini², Mahmood Tavallaei¹, Javad Gharechahi^{1*}

¹ Human Genetics Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Chemical Injuries Research Center, Baqiyatallah University of Medical sciences, Tehran, Iran

Received: 3 March 2019 Accepted: 14 December 2019

Abstract

Background and Aim: The role of the lung microbiome in respiratory complications associated with chemicals such as sulfur mustard or chlorine gas has yet to be determined. The aim of this study was to compare the structure and composition of the lung microbiome in chemically injured and healthy individuals in order to understand the relation between the population of the lung microbiota and respiratory complications caused by exposure to these chemicals.

Methods: To study lung microbiota, the bronchial alveolar lavage (BAL) fluids were collected from 17 chemically injured and 15 healthy cases during the bronchoscopy procedure. The diversity of lung bacteria present in BAL samples was explored using 16S rRNA gene sequencing.

Results: The lung microbiome dominated by members of phyla Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria and Synergistetes which collectively accounted for > 95% of sequences. At the genus level, members of the genera Prevotella, Leptotrichia, Atopobium, Aggregatibacter, Catonella, and Oribacterium showed more than 2-fold increase in abundance in the lung microbiome of chemically injured patients. Comparing lung bacterial community at the species level, however, revealed an increased prevalence of members of *Rothia mucilaginosa* (3-fold), *Prevotella melaninogenica* (2.7-fold), *Prevotella pallens* (3.5-fold), *Actinobacillus paraohaemolyticus* (2.5-fold), *Veillonella parvula* (2.5-fold), and *Neisseria subflava* (1.5-fold) in these patients.

Conclusion: An increased abundance of bacterial species known to associate with airway inflammation suggested their implications in respiratory failure in chemically injured patients. Monitoring and maintaining the homeostasis of the microbial population colonizing lung of chemically injured patients will pave the way to develop a more targeted treatment for these patients.

Keywords: Chemically Injured Veterans, Lung Microbiome, Bronchoscopy, 16S rRNA Sequencing, Metagenomics

آنالیز متاژنومیک میکروبیوم ریه در مصدومین شیمیایی و افراد سالم

مهیار شریف باقری^۱، علی قزوینی^۲، محمود تولایی^۱، جواد قره چاهی^{۱*}

^۱ مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران
^۲ مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: نقش میکروبیوم ریه در مشکلات ریوی ناشی از مواجهه با ترکیبات شیمیایی همچون گاز خردل یا کلر هنوز مشخص نشده است. هدف این مطالعه تعیین ساختار و ترکیب میکروبیوم ریه در مصدومین شیمیایی و مقایسه آن با افراد سالم به منظور درک ارتباط بین جمعیت میکروب‌های کلونیزه شده در ریه و مشکلات ریوی ناشی از مواجهه با این مواد شیمیایی بود.

روش‌ها: برای تعیین میکروبیوم ریه نمونه‌های برونکوالوئولار لاواژ (BAL) ۱۷ مصدوم شیمیایی و ۱۵ فرد سالم در حین عمل برونکوسکوپی جمع‌آوری شد. تنوع باکتری‌های موجود در نمونه‌های BAL جمع‌آوری شده به وسیله توالی‌یابی ژن کدکننده 16S rRNA بررسی شد.

یافته‌ها: اعضای شاخه‌های *Synergistetes* و *Fusobacteria* *Actinobacteria* *Proteobacteria* *Bacteroidetes* *Firmicutes* میکروبیوم غالب ریه را تشکیل می‌دهند که در مجموع بیش از ۹۵ درصد از کل توالی‌ها را به خود اختصاص می‌دهند. در سطح تاکسونومی جنس، اعضای جنس‌های *Oribacterium* و *Catonella* *Aggregatibacter* *Atopobium* *Leptotrichia* *Prevotella* ریه مصدومین شیمیایی افزایش فراوانی بیش از ۲ برابر نشان می‌دهند. اما مقایسه جمعیت باکتری‌های ساکن ریه در سطح گونه حکایت از افزایش فراوانی گونه‌های *Rothia mucilaginosa* (۳ برابر)، *Prevotella melaninogenica* (۲/۷ برابر)، *Prevotella pallens* (۳/۵ برابر)، *Actinobacillus parahaemolyticus* (۲/۵ برابر)، *Veillonella parvula* (۲/۵ برابر) و *Neisseria subflava* (۱/۵ برابر) در این بیماران دارد.

نتیجه‌گیری: افزایش فراوانی گونه‌های باکتریایی که حضور آنها توأم با التهاب راه‌های هوایی می‌شود، نشان از نقش آنها در مشکلات ریوی مصدومین شیمیایی دارد. کنترل و حفظ تعادل جمعیت میکروبی کلونیزه شده در ریه مصدومین شیمیایی راه را برای درمان هدفمند این بیماران و کاهش نارسایی‌های ریوی آنها هموار خواهد ساخت.

کلیدواژه‌ها: مصدومین شیمیایی، میکروبیوم ریه، برونکوسکوپی، توالی‌یابی 16S rRNA، متاژنومیکس.

*نویسنده مسئول: جواد قره چاهی. پست الکترونیک: jgharechahi@gmail.com

مقدمه

مصدومیت شیمیایی در نتیجه مواجهه با گازهای سمی که در جنگ به عنوان سلاح های نامتعارف کشتار جمعی مورد استفاده قرار می گیرند ایجاد می شود. استفاده از این نوع سلاح ها به شکل گاز خردل در طول جنگ تحمیلی ایران و عراق توسط رژیم بعث عراق باعث ایجاد مصدومیت های شیمیایی در هزاران نفر شده که هنوز با وجود گذشت سال ها از زمان مواجهه آنها با این عوامل همچنان از عوارض تنفسی و پوستی آن رنج می برند. مطالعات صورت گرفته تاکنون نتوانسته درمان قطعی و موثری برای مشکلات تنفسی و ریوی آنها فراهم کند. در این بیماران عفونت های مکرر ریوی یکی از مسائل جدی محسوب می شود که گاهی به درمان های بر پایه آنتی بیوتیک های رایج نیز پاسخگو نیستند. سیستم ایمنی این افراد نیز بواسطه مواجهه با گاز شیمیایی خردل به شدت تضعیف شده و توانایی پاسخ مناسب به عفونت های ایجاد شده در دستگاه تنفسی را ندارد (۱). همین امر زمینه رشد و کلونیزه شدن میکروب های بیماری زا در دستگاه تنفس آنها را فراهم می کند و احتمال درگیری این افراد با عفونت های مزمن را افزایش می دهد. ناراحتی های تنفسی، عفونت های مکرر و بازگشت کننده، التهاب ریه ها، و به موازات آن رنج بیماری و بار مالی درمان از جمله معضلاتی است که این گروه از بیماران درگیر آن هستند. بنابراین مطالعه میکروبیوم ریه و سایر بخش های دستگاه تنفسی این افراد و مقایسه آن با بیماری های دیگر که تظاهرات بالینی نسبتاً مشابهی دارند، مانند انسداد مزمن ریوی (COPD)، می تواند درک ما را از مکانیسم بیماری زایی گاز خردل افزایش دهد و زمینه را برای درمان نارسایی های ریوی آنها فراهم کند.

بر خلاف بیماران مبتلا به COPD، ریه مصدومین شیمیایی به ندرت دچار فیروز می شود (۱). مصدومین شیمیایی به وفور از نارسایی های مرتبط با برونشولیتیس رنج می برند (۲). بررسی های رادیولوژیکی دستگاه تنفس این بیماران حکایت از ضخیم شدن دیواره برونشال ها، احتباس هوا و گرفتگی برونشیت ها دارد (۲). مطالعات زیادی برونشکتازی را به عنوان مشکل مزمن مصدومین شیمیایی معرفی کرده اند (۳،۴). به نظر می رسد عفونت های ثانویه مکرر یکی از عوامل اصلی شکل گیری برونشکتازی در این بیماران است (۲). با توجه به این شواهد به نظر می رسد میکروب هایی که در ریه این گروه از بیماران کلونیزه و ساکن می شوند در ایجاد عفونت های ثانویه، التهاب و پاتوژن بیماری و مشکلات ریوی این افراد نقش کلیدی ایفا می کنند. شناسایی تاکسونومیک و بررسی فراوانی میکروب هایی که در ریه این افراد کلونیزه می شوند، می تواند درک ما را از آسیب های ریوی ایجاد شده در این بیماران بیشتر کند. از سوی دیگر، با شناسایی کامل میکروبیوم ریه می توان به راهکارهایی برای درمان و کنترل بیماری و مشکلات ریوی در آنها دست یافت.

Hilty و همکاران اولین گروهی بودند که به بررسی میکروبیوم

دستگاه تنفس تحتانی در بیماران مبتلا به انسداد مزمن ریوی و آسم در مقایسه با افراد سالم پرداختند (۵). متعاقباً، Charlson و همکاران، از طریق نمونه برداری با برونکوسکوپ دوگانه و بررسی میکروبیوم دستگاه تنفسی فوقانی و تحتانی، دریافتند که دستگاه تنفسی تحتانی بار میکروبی کمتری نسبت به دستگاه تنفس فوقانی دارد (۶). مطالعات پیشین نشان داده اند که در بیماری هایی مانند انسداد مزمن ریوی (۷،۸)، فیروز کیستی (۹)، آسم (۱۰)، فیروز ریوی با علل ناشناخته (۱۱) و آرتربیت روماتوئید همراه با حضور فاکتور روماتوئید سیستمیک (۱۲)، میکروبیوم ریوی دچار تغییراتی می شود. بسیاری از مطالعات افزایش جمعیت باکتری های متعلق به شاخه *Proteobacteria* که با سیل های گرم منفی موجود در ریه را نیز شامل می شوند در بیماری های مزمن مجاری هوایی گزارش داده اند در حالی که در شرایط طبیعی گونه های متعلق به شاخه *Bacteroidetes* جمعیت غالب میکروبیوم ریه را به خود اختصاص می دهند (۱۳). مصرف سیگار ممکن است از طریق افزایش جمعیت باکتری های جنس *Veillonella* موجب تغییر در میکروبیوم دستگاه تنفس فوقانی شود (۱۴). ارتباط بین *Prevotella* و *Veillonella* با تشدید التهاب در بیماران مبتلا به انسدادی ریوی مزمن نیز گزارش شده است (۱۴). شواهدی نیز وجود دارد که بروز و خامت در این بیماری با حضور گونه های *Haemophilus influenzae* یا *Pseudomonas aeruginosa* ارتباط دارد (۱۵).

در مطالعه ای که بر روی بیماران آسمی و COPD و افراد سالم بعنوان کنترل صورت گرفت مشخص شد *Proteobacteria* های بیماری زا مانند گونه های متعلق به جنس *Haemophilus* با فراوانی بیشتری در نمونه های برونش افراد آسمی و COPD دیده می شوند در حالی که گونه های متعلق به شاخه *Bacteroidetes* شامل گونه های متعلق به جنس *Prevotella* با فراوانی بیشتری در نمونه های کنترل دیده شدند (۵). در افراد مبتلا به سیستمیک فیروزیس عفونت و التهاب مزمن راه های هوایی سبب بیماری های پیشرونده ریوی و افزایش مرگ و میر ناشی از این بیماری می شود (۱۶). در افراد مبتلا به این بیماری عفونت با پاتوژن هایی مانند *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Burkholderia cepacia* به وفور دیده می شود (۱۷). Hang و همکاران (۱۸) اخیراً در مطالعه ای به بررسی میکروبیوم دستگاه تنفس فوقانی در پرسنل نظامی که با گازهای شیمیایی مواجه شده بودند پرداختند. اگرچه این مطالعه نتوانست تغییرات خاصی در میکروبیوم گروه هدف شناسایی کند، اما بطور قطع بررسی میکروبیوم دستگاه تنفس فوقانی به تنهایی نمی تواند نتایج قابل اتکایی مانند آنچه در مطالعه میکروبیوم دستگاه تنفس تحتانی مشاهده می کنیم ارائه دهد.

تاکنون مطالعه مشابهی بر روی میکروبیوم همزیست در دستگاه تنفس مصدومین شیمیایی صورت نگرفته است. هدف این مطالعه شناسایی میکروبیوم ریه در مصدومین شیمیایی و بررسی

تغییرات احتمالی آن در مقایسه با افراد سالم فاقد مشکلات ریوی می‌باشد.

روش‌ها

در این مطالعه مورد-شاهدی (case-control)، تعداد ۳۲ نفر شامل ۱۵ فرد سالم فاقد مشکلات ریوی (گروه کنترل) و ۱۷ مصدوم شیمیایی (گروه بیماران) شرکت کردند. مصدومین شیمیایی وارد شده در این مطالعه شامل پرسنل نظامی بودند که در جنگ سوریه در معرض گازهای شیمیایی (عموماً گاز کلر) قرار گرفته بودند. گروه کنترل در واقع بیمارانی بودند که به دلایلی غیر از مشکلات ریوی (مانند سرطان) نیاز به عمل برونکوسکوپی داشتند اما از نظر تنفسی کاملاً سالم بودند. معیار ورود افراد به مطالعه شامل عدم سابقه بیماری عفونی، عدم سابقه بستری در بیمارستان در ۶ ماه گذشته، فقدان بیماری زمینه‌ای از جمله دیابت، بیماری خود ایمنی، آلرژی، آسم، فیبروز کیستی و یا سایر بیماری‌های مزمن، عدم مصرف داروهای ضد میکروبی و عدم استعمال دخانیات طی ۸ هفته گذشته بود. در مورد گروه بیماران علاوه بر موارد فوق وجود سابقه پزشکی مستند دال بر مصدومیت شیمیایی در جنگ نیز در نظر گرفته شد. شناسایی بیماران در طول مراجعه آنها جهت معاینات پزشکی به یکی از بیمارستان‌های نظامی تهران انجام گرفت. حجم نمونه مورد نیاز با در نظر گرفتن حدود اطمینان ۰/۹۵ و پاور ۰/۸ مطابق فرمول ارائه شده در <https://epitools.ausvet.io/casecontrolss> تعیین شد.

این مطالعه بر روی نمونه‌های برونکو آلوئولار لاولاژ (BAL) که از طریق عمل برونکوسکوپی اخذ شده بود صورت گرفت. عمل نمونه‌گیری از مناطق مختلف ریه با توجه به محل آسیب ریوی انجام گرفت. بخشی از نمونه‌های گرفته شده به منظور بررسی کشت میکروبی و آزمون آنتی بیوگرام به بخش میکروب شناسی آزمایشگاه بالینی ارسال شد. عمل نمونه‌گیری در بازه زمانی یک ساله زمستان ۱۳۹۶-۱۳۹۵ انجام گرفت. تاریخچه پزشکی افراد، اطلاعات مربوط به آزمون عملکرد تنفسی (اسپیرومتری) و اطلاعات دموگرافیک آنها در برگیرنده جنسیت، سن، سابقه مصرف سیگار، سابقه بیماری قبلی، سابقه مصرف دارو، و غیره از پرونده پزشکی آنها استخراج شد. نمونه‌های دریافتی در کمتر از یک ساعت در دمای ۸۰- درجه سلسیوس و تا زمان انجام مرحله استخراج DNA نگهداری شدند. از ۴۰ نمونه BAL گرفته شده، ۸ نمونه در گزارش کشت میکروبی رشد غیر معمول باکتری نشان دادند و بنابراین از مطالعه خارج شدند. اطلاعات دموگرافی و شاخص‌های پزشکی افراد مورد مطالعه در جدول ۱- آورده شده است.

استخراج DNA: برای استخراج DNA نمونه‌ها از فریزر خارج شده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس ذوب شدند. از آنجا که انجام پروسه استخراج DNA با توجه به امکانات و شرایط موجود در یک روز امکانپذیر نبود لذا نمونه‌ها به صورت گروه‌های چندتایی

برای استخراج DNA انتخاب شدند. نمونه‌های ذوب شده در لوله‌های فالكون به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه جهت جداسازی سلول‌های میکروبی سانتریفوژ شدند. سپس مایع رویی خارج شد و رسوب میکروبی هر نمونه بصورت جداگانه جهت استخراج DNA طبق دستورالعمل کیت QIAamp DNA stool minikit برای استخراج DNA از مدفوع برای تشخیص پاتوژن‌ها مورد استفاده قرار گرفت. مقدار ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده برای سنجش کیفیت DNA بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد ران شد. برای اندازه‌گیری غلظت DNA استخراج شده نیز از دستگاه نانودراپ استفاده شد. در نهایت میکروتیوب‌های حاوی DNA استخراج شده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا زمان انجام مراحل PCR نگهداری شدند.

تکثیر قطعه‌ای از ژن کدکننده 16S rRNA: ژن 16S rRNA به واسطه حفظ شدگی بالا و به دلیل دارا بودن ۹ ناحیه متغیر، هدف مناسبی جهت بررسی‌های فیلوژنتیکی و تعیین قرابت خویشاوندی میکروب‌ها می‌باشد. فرایند تکثیر و بارکد گذاری محصولات PCR نمونه‌های مختلف طی دو واکنش پیاپی انجام گرفت. در PCR اولیه نمونه‌ها بوسیله پرایمرهای 341F و 785R که امکان تکثیر نواحی متغیر ۳ و ۴ در حد فاصل نکلئوتیدهای ۳۴۱ تا ۷۸۵ ژن 16S rRNA را فراهم می‌کنند تکثیر شدند. جهت انجام PCR اولیه به میزان ۱۰ میکرولیتر از مخلوط مسترمیکس، ۱۲ میکرولیتر آب دیونیزه، ۱ میکرولیتر پرایمر فوروارد، ۱ میکرولیتر پرایمر ریورس، و ۱ میکرولیتر معادل ۲۰ تا ۳۰ نانوگرم DNA به تیوب‌های PCR اضافه شد. حجم نهایی واکنش PCR ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد. همچنین برای نمونه کنترل منفی که جهت بررسی صحت کار و نبود آلاینده و عوامل مداخله‌گر در محیط واکنش استفاده می‌شود، به جای DNA الگو، ۱ میکرولیتر آب دیونیزه استفاده شد. واکنش PCR با یک مرحله واسرشت سازی (denaturation) در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد برای ۵ دقیقه آغاز شد و شامل ۲۵ سیکل ۳۰ ثانیه واسرشت سازی در دمای ۹۵ درجه، ۳۰ ثانیه اتصال (annealing) در دمای ۵۵ درجه و ۳۰ ثانیه تکثیر (extension) در دمای ۷۲ درجه شد و با یک مرحله نهایی تکثیر در دمای ۷۲ درجه برای ۷ دقیقه خاتمه داده شد. در پایان جهت بررسی صحت عملکرد PCR مقدار یک میکرولیتر از محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد ران شد. برای انجام PCR ثانویه از ۲ میکرولیتر محصول PCR اولیه به عنوان الگو استفاده شد. در این مرحله از پرایمرهای اختصاصی شرکت Illumina استفاده شد. این پرایمرها به گونه‌ای طراحی شده‌اند که در انتهای آنها توالی‌های بارکد و توالی‌های جایگاه اتصال پرایمرهای توالی‌یابی (آداپتور) اضافه شده است. با توجه به اینکه هر دو پرایمر فوروارد و ریورس دارای بارکدهای ۸ نوکلئوتیدی هستند از ترکیب پرایمرهای مختلف می‌توان برای بارکدگذاری نمونه‌های مختلف استفاده کرد. واکنش PCR ثانویه مشابه PCR

نمونه با کمترین تعداد توالی می‌باشد نمونه برداری شدند. برای بررسی تنوع درون نمونه‌های شاخص‌های *Observed_species*، *Chao1*، *Shannon* و *Goods_coverage* بوسیله دستور `alpha_diversity.py` پکیج نرم افزاری QIIME محاسبه شدند. تنوع بین نمونه‌ای نیز برای شاخص‌های بتای `weighted` و `unweighted` مربوط به ماتریس `Unifrac distance` بوسیله نرم افزار تحت وب `www.microbiomeanalyst.ca` محاسبه شد. نتایج بدست آمده بوسیله پلات‌های `principal coordinate` analysis (PCoA) نمایش داده شدند.

آزمون‌های آماری: برای مقایسه فراوانی تاکساهای دیده شده از آزمون آماری `t-test` استفاده شد. پکیج نرم افزاری QIIME از طریق دستور `group_significance.py` امکان شناسایی تاکساهای با فراوانی نسبی متفاوت در گروه کنترل نسبت به گروه مصدومین شیمیایی در سطوح مختلف تاکسونومی (شاخه، خانواده و جنس) را فراهم کرد. برای مقایسه شاخص‌های تنوع آلفا نیز از آزمون آماری `t-test` استفاده شد. برای مقایسه شاخص‌های تنوع بتا از آزمون آماری `ANOSIM` مربوط به پکیج نرم افزاری `vegan` در نرم افزاری آماری R استفاده شد.

ملاحظات اخلاقی: مطالعه حاضر توسط کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله با کد `IR.BMSU.REC.1395.356` تایید شده است. با توجه به اینکه عمل برونکوسکوپی یک عمل نیمه تهاجمی محسوب می‌شود و نمی‌توان به راحتی از هر بیماری نمونه گیری کرد، قبل از عمل برونکوسکوپی بیماران با امضای رضایتنامه کتبی موافقت خود را برای ورود به این مطالعه اعلام کردند.

نتایج

اطلاعات دموگرافی بیماران و افراد کنترل: از مجموع ۳۲ فرد شرکت کننده در این مطالعه ۲۹ نفر مرد و ۳ نفر زن بودند. میانگین سنی در بین تمام بیماران ۴۹ سال بود که در این بین، میانگین سنی گروه نرمال ۶۲ و گروه مصدومین شیمیایی ۳۷ سال بود ($p < 0.01$). با توجه به اینکه افراد غیر مصدوم (گروه کنترل) از بین بیماران سرطانی که غالباً برای بررسی متاستاز در ریه تحت عمل برونکوسکوپی قرار می‌گرفتند انتخاب شدند میانگین سنی آنها در مقایسه با گروه مصدومین شیمیایی که غالباً جوانان پرسنل نظامی بودند اختلاف سنی زیادی نشان می‌دهند. اطلاعات دموگرافیک افراد حاضر در این مطالعه به تفصیل در جدول ۱- آورده شده است.

برای بررسی وضعیت تنفسی بیماران شاخص‌های اسپیرومتری شامل FEV_1 و FEV_1/FVC در هر دو گروه مصدومین شیمیایی و نرمال اندازه گیری شد.

اول انجام گرفت با این تفاوت که تنها تعداد سیکل‌های تکثیر به ۱۵ کاهش داده شد. به منظور تایید واکنش PCR میزان یک میکروولتر از محصول PCR ثانویه بر روی ژل آگارز ۲ درصد ران شد. وجود یک قطعه ۵۰۰ جفت بازی تایید کننده واکنش PCR بود. در نهایت ۷ میکروولتر از محصول PCR ثانویه بر روی ژل آگارز ران شد و ژل در محل قرار گرفتن قطعه DNA برش داده شده و DNA موجود در ژل با استفاده از کیت استخراج از ژل (GeneAll) تخلیص شد.

توالی یابی محصولات PCR: قبل از انجام توالی یابی نمونه‌های بارکد شده به روش فلوریمتری کمیت سنجی شده و سپس به میزان مساوی با هم مخلوط شده و برای تهیه کتابخانه مورد نیاز سیستم توالی‌یابی Illumina MiSeq مورد استفاده قرار گرفتند. توالی یابی توسط شرکت ماکروژن (سئول- کره جنوبی) انجام گرفت. نمونه‌ها به صورت `paired-end` از هر انتها به اندازه ۳۰۰ جفت باز تعیین توالی شدند. پس از حذف توالی‌های با کیفیت خواناتر پایین توالی‌های باقیمانده به صورت فایل‌های با پسوند FASTQ ذخیره شده و برای انجام آنالیزهای بیوانفورماتیک مورد استفاده قرار گرفتند.

آنالیز بیوانفورماتیک توالی‌های بدست آمده: با توجه به اینکه توالی‌های بدست آمده به صورتی `paired-end` خوانش شده بودند لازم است قبل از استفاده از آنها برای آنالیزهای فیلوژنتیکی این توالی‌ها را اسمبل کرده و به یک توالی واحد تبدیل کنیم. برای این کار از ابزار `Flash` استفاده شد (۱۹).

توالی‌های اسمبل شده سپس به وسیله دستور `split_libraries_fastq.py` که یکی از دستورات مربوط به پکیج نرم افزاری QIIME می‌باشد (۲۰) برای `demultiplexing` و حذف توالی‌های نامناسب پردازش شدند. این دستور توالی پرایمرهای استفاده شده در تکثیر اولیه و نیز توالی‌های بارکدها و آداپتورهای مورد استفاده در هنگام توالی یابی را از انتهای توالی‌ها حذف می‌کند. با توجه به حذف بارکدها در این مرحله به ابتدای نام هر توالی نام نمونه منشا آن اضافه می‌شود تا امکان شناسایی آن فراهم شود. در گام بعدی توالی‌های کامریک با استفاده از نرم افزار `VSEARCH` و پایگاه اطلاعاتی `16S rRNA (RDP release 11.5)` شناسایی و حذف شدند (۲۱). توالی‌های باقیمانده سپس برای شناسایی OTUs (`Operational taxonomic units`) در سطح شباهت توالی ۹۷٪ کلاستر شدند. جزییات نحوه شناسایی OTU ها در مقاله قبلی آورده شده است (۲۲). با توجه به اینکه تعدادی زیادی از OTU ها به صورت منفرد در نمونه‌ها دیده می‌شوند برای حذف این نوع از OTU ها تمام OTU هایی که فراوانی کمتر از ۰/۰۰۱ درصد داشتند حذف شدند. برای اندازه گیری شاخص‌های تنوع آلفا و بتا لازم است نمونه‌ها از نظر میزان عمق خوانش توالی‌ها یکسان باشند. برای این منظور تمام نمونه‌ها به طور تصادفی در عمق خوانش ۱۱۸۹۰ که معادل عمق خوانش

جدول-۱. اطلاعات دموگرافی مصدومین شیمیایی (بیماران) و افراد سالم (غیر بیمار) وارد شده در مطالعه

ویژگی	گروه کنترل (N)	گروه مصدومین شیمیایی (C)	p-value
تعداد شرکت کننده‌ها	۱۵	۱۷	-
جنسیت مرد	۱۲	۱۷	-
زن	۳	۰	-
سابقه مصرف سیگار	۴	۲	-
غیر سیگاری	۱۱	۱۵	-
مصرف آنتی بیوتیک در ۸ هفته گذشته	-	-	-
میانگین سن \pm انحراف معیار	۶۲ \pm ۷	۳۷ \pm ۱۰	P < 0.01
میانگین FEV1 \pm انحراف معیار	۸۶ \pm ۱۱	۷۸ \pm ۸	P < 0.05
میانگین FEV1/FVC \pm انحراف معیار	۹۹ \pm ۸	۹۵ \pm ۱۰	P > 0.05

تنوع زیستی و برآورد فراوانی نسبی تاکسها در نمونه‌های بدست آمده از مصدومین شیمیایی و افراد سالم مورد استفاده قرار گرفت. جدول-۲ آنالیز تنوع درون نمونه‌ای (تنوع آلفا) میکروبیوم ریه مصدومین شیمیایی (C) و افراد سالم (N) را نشان می‌دهد. تنوع آلفا با استفاده از شاخص‌های تنوع *Chao1*، *Observed_species*، *Shannon*، *Simpson* و *Goods_coverage* اندازه‌گیری شده است. برای بررسی آماری داده‌ها بین گروه مصدومین و گروه کنترل از آزمون آماری t-test استفاده شد.

نتایج حاصل از شاخص‌های تنوع آلفا و بتا و منحنی‌های

rarefaction: شاخص تنوع آلفا (تنوع درون نمونه‌ای): شاخص‌های تنوع آلفا برای بررسی تنوع موجودات زنده در یک نمونه یا یک محیط اکولوژیکی خاص استفاده می‌شوند. این شاخص‌ها نشان می‌دهند که آیا بین تعداد تاکسهای موجود در نمونه‌های مختلف و نیز پراکندگی آنها ارتباط معنی‌داری وجود دارد یا خیر. نتایج شاخص‌های تنوع آلفا برای نمونه‌های مصدومین شیمیایی و افراد گروه کنترل در جدول-۲ آورده شده است. شاخص تنوع *Chao1* که برآوردی از میزان غنای گونه‌ای (species richness) است به طور معنی‌داری در مصدومین شیمیایی در مقایسه افراد نرمال افزایش نشان می‌دهد ($p = 0.018$ آزمون آماری t-test). میانگین این شاخص در افراد مصدوم شیمیایی ۱۲۳۴ است در صورتی که برای افراد سالم ۹۳۲ می‌باشد که نشان دهنده تنوع بسیار بیشتر میکروب‌های ساکن در ریه مصدومین شیمیایی است. اما شاخص تنوع *observed species* که نشان دهنده تعداد گونه‌های دیده شده در هر نمونه است با وجود اینکه در مصدومین شیمیایی در مقایسه با افراد نرمال بسیار بیشتر است (۸۰۷ در برابر ۶۴۷) اما تفاوت دیده شده به لحاظ آماری معنی‌دار نیست ($p > 0.05$) آزمون t-test) که نشان دهنده واریانس بالای بین افراد مختلف هر گروه است. شاخص‌های تنوع *Shannon* (که یکنواختی پراکندگی جمعیت میکروبی را نشان می‌دهد) و غالبیت *Simpson* نیز تنوع معنی‌داری بین گروه مصدومین شیمیایی و افراد سالم نشان ندادند ($p > 0.05$)، که دلالت بر یکنواختی جامعه میکروبی دیده شده در هر دو گروه مورد آزمایش دارد.

میانگین شاخص FEV1 در گروه مصدومین شیمیایی بصورت محسوسی در مقایسه با گروه نرمال کاهش نشان می‌داد (۷۸ در برابر ۸۶، $p < 0.05$) که این مسئله در خصوص شاخص FEV1/FVC نیز صدق می‌کرد (۹۵ در برابر ۹۹) اما تفاوت دیده شده در از نظر آماری معنی‌دار نیست ($p > 0.05$).

نتایج توالی‌یابی: تعیین توالی ۳۲ نمونه محصولات PCR

حاصل از تکثیر ژن 16S rRNA در دو گروه مصدومین شیمیایی و افراد سالم منجر به تولید ۱۸۵۰۵۸۰ جفت توالی (paired end) با میانگین طولی ۳۰۰ جفت باز شد. اسمبل توالی‌های جفتی (فوروارد و ریورس) با استفاده از نرم افزار flash امکان‌بازایی ۱۶۶۷۵۰۲ توالی امپلیکون با میانگین طولی ۴۵۵ جفت باز را فراهم کرد. به طور متوسط برای هر نمونه ۵۲۱۰۰ توالی rRNA ۱۶S ایجاد شد. قبل از اینکه بتوان این توالی‌ها را برای شناسایی واحدهای تاکسونومی عملیاتی (OTUs) به کار گرفت لازم است توالی‌های با کیفیت پایین (میانگین کیفیت کمتر از ۲۰) و توالی‌های خیلی کوتاه (کمتر از ۲۰۰) و یا خیلی بلند (بیشتر از ۱۰۰۰)، توالی‌های دارای نوکلئوتید ناشناخته (N) و توالی‌های با هموپلیمرهای با طول بیشتر از ۶ نوکلئوتید حذف شوند و همچنین توالی بارکدها، آداپتورهای اضافه شده در حین توالی‌یابی و نیز توالی پرایمرهای استفاده شده در PCR از انتهای امپلیکون‌های rRNA ۱۶S حذف شوند. همه این اصلاحات بوسیله دستور *split_libraries_fastq.py* نرم افزار QIIME انجام گرفت که منجر به حذف ۱۵۲۶۱۰ توالی نامطلوب شد. بررسی توالی‌های باقیمانده برای شناسایی و حذف توالی‌های کایمریک منجر به شناسایی ۳۸۹۵۲۵ توالی کایمریک شد. پس از حذف توالی‌های کایمریک توالی‌های باقیمانده برای شناسایی OTUs در سطح شباهت توالی ۹۷ درصد کلاستر شدند که به شناسایی ۵۷۷۸۷ واحد تاکسونومی انجامید. برای حذف واحدهای تاکسونومی با فراوانی اندک، OTU‌های با فراوانی کمتر از ۰/۰۰۱ درصد از جدول OTU حذف شدند. در مرحله بعدی برای همگن سازی عمق خوانش نمونه‌ها، همه نمونه‌ها در عمق خوانش ۱۱۸۹۰ که معادل عمق خوانش نمونه با کمترین تعداد توالی است (N14) نمونه برداری شدند. در نهایت ۳۴۶۱ واحد تاکسونومی (OTUs) برای آنالیزهای

جدول-۲. آنالیز تنوع درون نمونه‌های (تنوع آلفا) میکروبیوم ریه مصدومین شیمیایی (C) و افراد سالم (N)

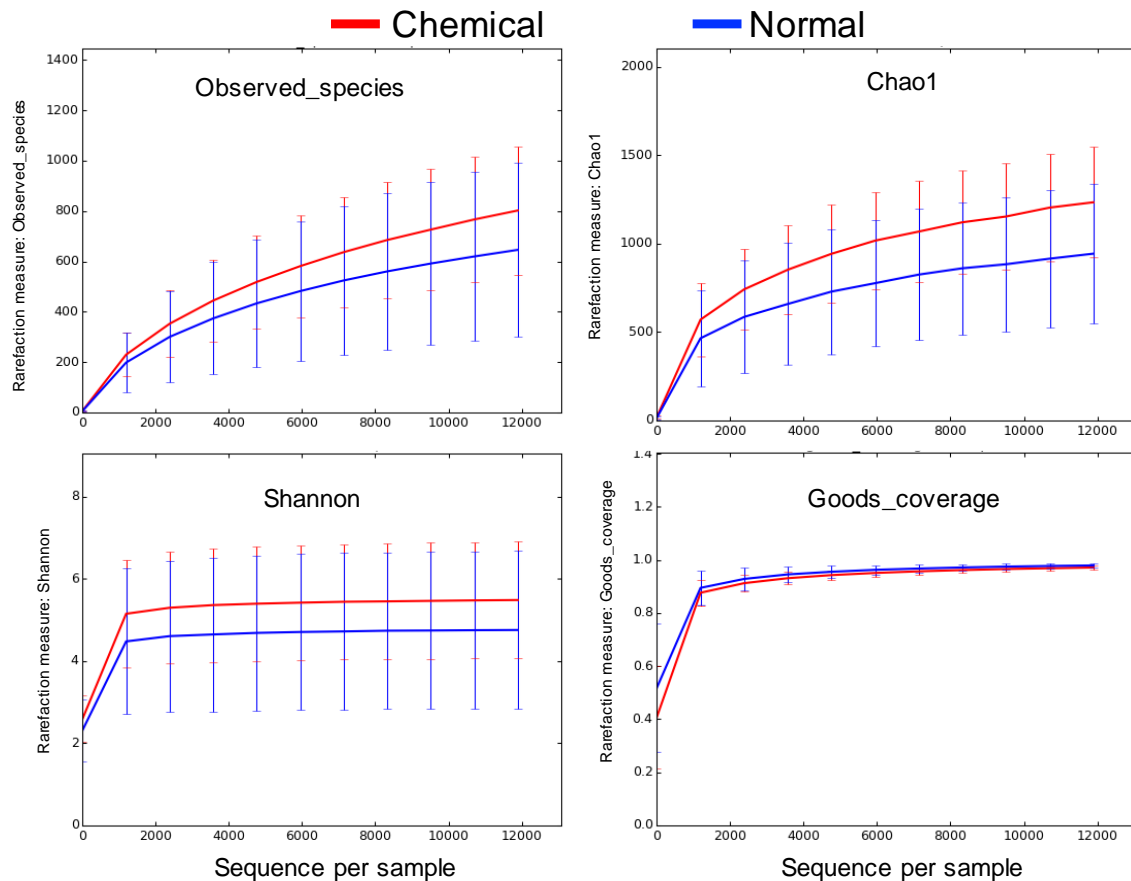
Group	Sample ID	Chao1	Observed_species	Shannon	Simpson	Goods_coverage	
Chemical cases	CAP07	1299	1162	7.73	0.96	0.98	
	CAS05	1260	724	5.63	0.93	0.97	
	CAT06	1246	725	5.33	0.91	0.97	
	CEB01	847	538	3.19	0.56	0.98	
	CGH02	1209	734	5.09	0.86	0.97	
	CGP13	1264	675	5.30	0.93	0.97	
	CHJ15	641	254	2.20	0.45	0.99	
	CJF12	1293	796	5.34	0.92	0.97	
	CKR14	981	577	5.57	0.95	0.98	
	CMV10	1591	1211	7.58	0.98	0.96	
	CPS11	1189	733	5.49	0.92	0.97	
	CRA09	1344	977	6.86	0.96	0.97	
	CSD16	864	647	3.55	0.65	0.98	
	CSV04	1278	819	5.62	0.92	0.97	
	CTR03	1892	1298	7.17	0.97	0.95	
	CVZ17	1445	840	5.91	0.95	0.97	
	CYA08	1350	1009	5.89	0.92	0.97	
	Normal cases	NAM13	1311	1011	6.12	0.90	0.97
		NAR02	491	194	2.60	0.69	0.99
		NBD04	817	625	5.16	0.91	0.98
NDH14		516	301	3.76	0.83	0.99	
NGH08		711	380	3.54	0.79	0.98	
NHL01		331	157	0.52	0.08	0.99	
NHS07		1487	1069	6.61	0.95	0.97	
NJL15		1576	1212	7.13	0.96	0.97	
NMH11		867	560	4.47	0.88	0.98	
NMR09		1288	985	7.00	0.96	0.97	
NOS10		534	360	3.47	0.77	0.99	
NPR12		991	580	4.22	0.78	0.98	
NSR03		1369	1174	7.88	0.97	0.98	
NVL06		990	617	5.57	0.94	0.98	
NZM05		706	480	3.40	0.73	0.98	

شاخص‌های 'observed_species'، 'Chao1'، 'Shannon' و 'Goods_coverage' در شکل-۱ آورده شده است. بر اساس شاخص تنوع observed species در مورد تعدادی از نمونه‌ها عمق توالی یابی کافی بوده و نمودارها به plateau نزدیک شده‌اند ولی در مورد بسیاری از نمونه‌ها برای رسیدن به حد نهایت تنوع گونه‌های میکروبی نیاز به تعداد توالی بیشتری است.

شاخص‌های تنوع بتا (تنوع بین نمونه‌ای): برای بررسی ترکیب و ساختار گونه‌های میکروبی بین گروه‌های تیماری مختلف از شاخص‌های تنوع بتا استفاده می‌شود. برای این منظور از شاخص‌های تنوع غیر فیلوژنتیک مانند Bray_curtis و Jensen shannon و یا شاخص‌های فیلوژنتیکی مانند weighted unifracs و unifracs استفاده می‌شود. نتایج حاصل از آنالیز تنوع بین نمونه‌ای با استفاده از شاخص‌های Bray_curtis، weighted unifracs و Jensen shannon در شکل-۲ به صورت پلات‌های PCoA آمده است.

از طرف دیگر شاخص تنوع Goods_coverage بین گروه مصدومین و افراد سالم معنی دار می‌باشد ($p < 0.008$) و میانگین آن در گروه کنترل ۰/۹۷۹ و در گروه مصدومین ۰/۹۷۱ است که نشان می‌دهد عمق توالی یابی انجام شده برای بررسی تنوع میکروبی موجود در نمونه‌های مصدوم شیمیایی و افراد سالم کفایت می‌کند، البته در قیاس با افراد سالم برای شناسایی میکروب‌های موجود در ریه افراد مصدوم شیمیایی به تعداد توالی بیشتری نیاز است.

منحنی Rarefaction: منحنی‌های Rarefaction با نمونه‌گیری‌های تصادفی بدون جایگزینی، کفایت عمق توالی یابی برای بررسی تنوع جامعه میکروبی در یک محیط اکولوژیکی خاص را بر اساس شاخص‌های تنوع مختلف نشان می‌دهند. در این منحنی‌ها هر چه انتهای نمودار به سطح افقی (plateau) نزدیک شده باشد نشان دهنده کفایت عمق توالی یابی برای بررسی تنوع میکروبی بواسطه آن شاخص تنوع می‌باشد. منحنی rarefaction



شکل-۱. منحنی‌های rarefaction

بررسی تناسب عمق خوانش توالی‌های هر یک از نمونه‌ها با میزان تنوع میکروبیوم ریه در مصدومین شیمیایی و افراد گروه کنترل (نرمال). این منحنی‌ها با نمونه برداری تصادفی بدون جایگزینی برآوردی از میزان تنوع میکروبی بر اساس شاخص‌های تنوع Observed_species، Chao1، Shannon و Goods_coverage (محور X) را نشان می‌دهند. (محور Y) را به عنوان تابعی از تعداد توالی‌های نمونه برداری شده (محور X) را نشان می‌دهند.

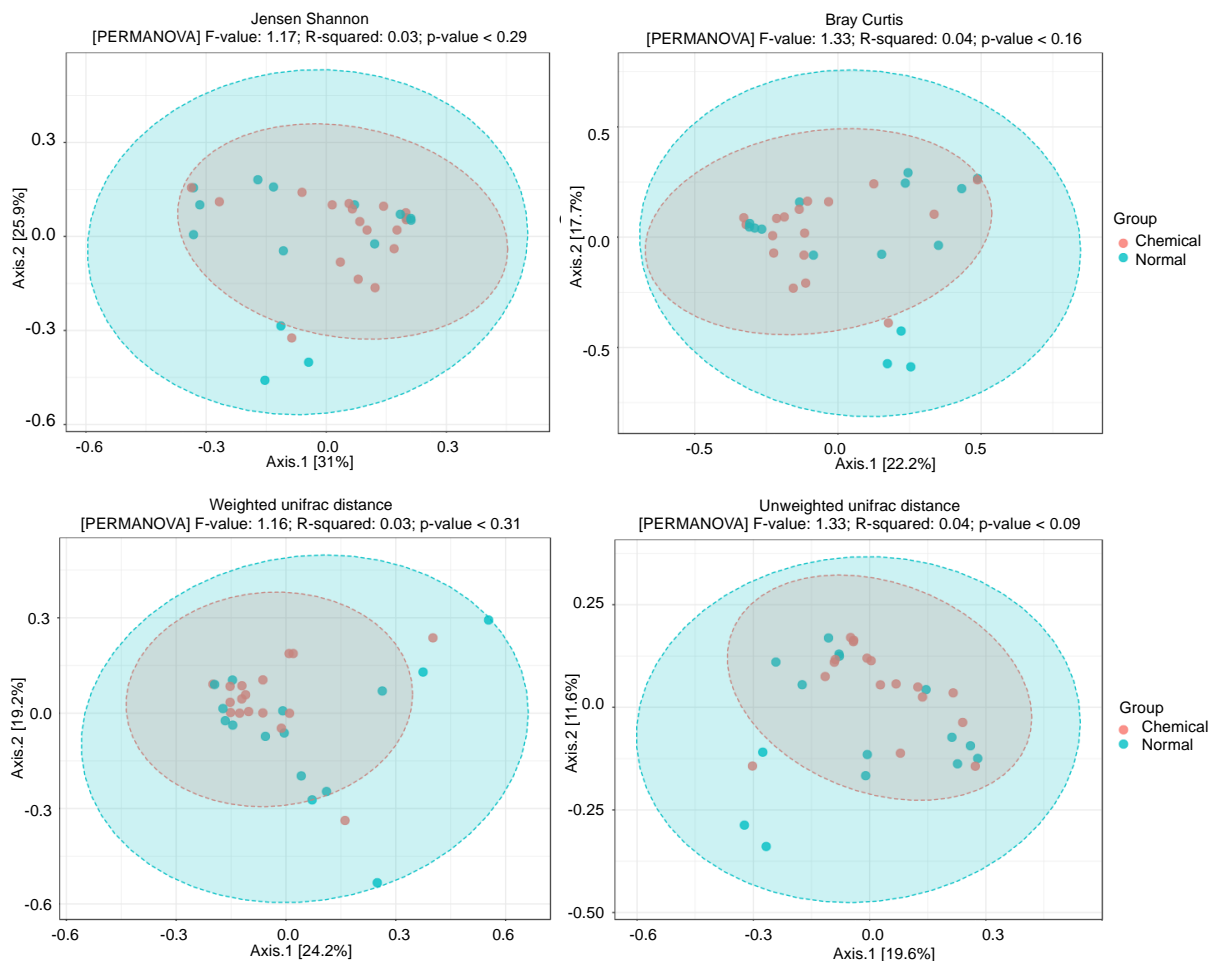
حضور نشان می‌دهند.

ترکیب میکروبیوم ریه در مصدومین شیمیایی و افراد

سالم: بررسی ترکیب میکروبیوم ریه در گروه مصدومین شیمیایی و افراد سالم نشان داد که جمعیت غالب میکروبیوم ریه را گونه‌های متعلق به شاخه‌های *Firmicutes*، *Bacteroidetes*، *Proteobacteria*، *Actinobacteria* و *Fusobacteria* تشکیل می‌دهند. این شاخه‌ها در مجموع چیزی حدود ۹۵ درصد از کل میکروبیوم ریه را به خود اختصاص می‌دهند. در گروه مصدومین شیمیایی گونه‌های متعلق به شاخه‌های *Firmicutes*، *Bacteroidetes* و *Proteobacteria* به ترتیب با ۳۲ درصد، ۲۷ درصد و ۲۱ درصد فراوانترین گروه باکتری‌ها بودند. در صورتی که گروه کنترل بعد از *Firmicutes* با ۳۰ درصد *Proteobacteria* با ۲۷ درصد و *Bacteroidetes* با ۱۷ درصد فراوان ترین باکتری‌های موجود در ریه بودند (شکل-۳). تفاوت‌های دیده شده در هیچ یک از شاخه‌های باکتریایی بین گروه مصدومین شیمیایی و افراد سالم از نظر آماری (آزمون آماری t-test) معنی دار نیست ($p > 0.05$) که ممکن است به واسطه واریانس بالای فراوانی آنها در افراد تشکیل دهنده هر گروه باشد.

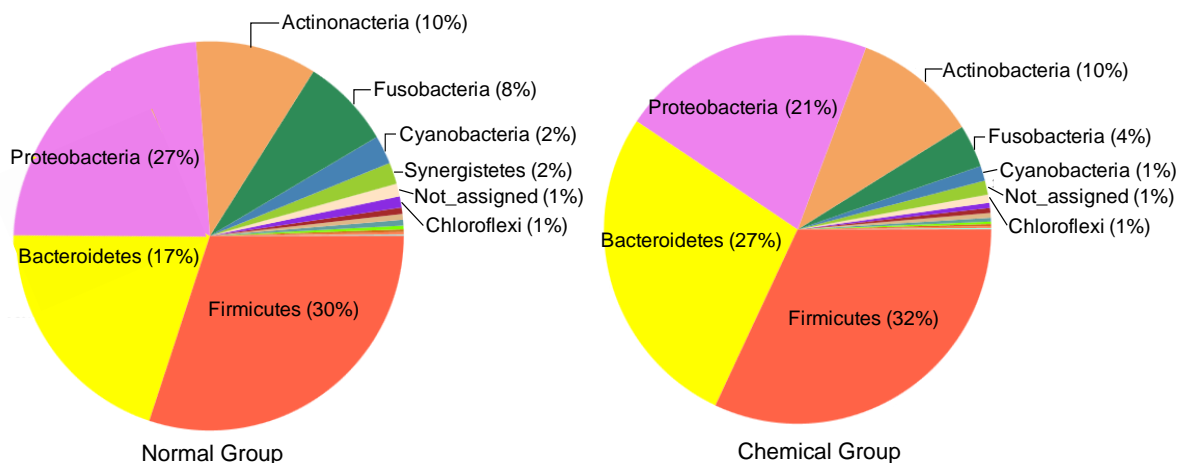
همان طور که از شکل‌ها مشخص است ساختار جامعه میکروبی ساکن ریه مصدومین شیمیایی تا حدودی متمایز از جامعه میکروبی ساکن در ریه افراد سالم است. با این حال با توجه به همپوشانی زیاد بین گروه کنترل و گروه مصدومین شیمیایی دو گروه از هم تفکیک نشده‌اند ($p > 0.05$ آزمون آماری ANOSIM). بر اساس شاخص تنوع فیلوژنتیکی weighted unfrac که علاوه بر فراوانی نسبی تاکسها قرابت خویشاوندی آنها را نیز در نظر می‌گیرد، اختلاف ساختار میکروبیوم بین افراد مختلف گروه مصدومین شیمیایی حداقل ممکن است.

این نتیجه نشان می‌دهد میکروب‌های موجود در ریه مصدومین شیمیایی چه به لحاظ فراوانی و چه از نظر فاصله تکاملی و ژنتیکی شباهت زیادی نشان می‌دهند که حکایت از کلونیزه شدن یک جامعه میکروبی منحصر به فرد در ریه این افراد دارد. بر مبنای شاخص unweighted unfrac که تنها وجود و عدم وجود تاکسها و قرابت خویشاوندی آنها را در محاسبه فاصله بین جوامع میکروبی لحاظ می‌کند، تفاوت بین افراد مصدوم شیمیایی بیشتر نمایان شده است که نشان می‌دهد تفاوت در میکروبیوم ریه این افراد بیشتر به واسطه تاکسهای است که الگوی حضور و عدم



شکل-۲. تنوع بین نمونه‌های (تنوع بتا) میکروبیوم مصدومین شیمیایی و افراد گروه کنترل (نرمال)

تنوع بتا به بوسیله شاخص‌های تنوع Jensen Shannon، Bray Curtis، Weighted unifracs و Unweighted unifracs بررسی شد. ماتریس عدم تشابه بدست آماده بوسیله پلات‌های PCoA (Principle COordinate Analysis) به نمایش درآمده است.



شکل-۳. فراوانی میکروبیوم ریه در سطح تاکسونومی شاخه در گروه مصدومین شیمیایی و افراد گروه کنترل (نرمال)

فراوانی نسبی تاکسها بر اساس OTUs های دیده شده با فراوانی بیشتر از ۰/۰۰۱ درصد در کل نمونه‌ها محاسبه شده است. تفاوت در فراوانی تاکسهای مختلف بوسیله آزمون آماری t-test برآورد شده و در متن توصیف شده است.

Pasteurellaceae, *Fusobacteriaceae*, *Neisseriaceae*,
Campylobacteraceae, *Paraprevotellaceae*
Hyphomicrobiaceae و *Moraxellaceae* دارد که به ترتیب
۸۱ و ۷۸ درصد از کل میکروبیوم ریه در مصدومین شیمیایی و افراد

بررسی ترکیب میکروبیوم در سطح خانواده حکایت از فراوانی
غالب گونه‌های متعلق به خانواده‌های *Prevotellaceae*,
Micrococcaceae, *Veillonellaceae*, *Streptococcaceae*,
Rickettsiaceae و *Porphyromonadaceae*

مصدومین ۵/۲ درصد و در گروه کنترل ۴/۵ درصد، *P. melaninogenica* در مصدومین ۱۳/۲ درصد و در گروه کنترل ۴/۸۶ درصد و *R. mucilaginoso* در مصدومین ۳/۳۲ درصد و در گروه کنترل ۱/۱ درصد از توالی‌ها را بخود اختصاص می‌دهند. مقایسه سطح فراوانی گونه‌های شناسایی شده در گروه مصدومین شیمیایی در مقایسه با گروه کنترل حکایت از افزایش ۳ برابری *R. mucilaginoso*، ۲/۷۱ برابری *P. melaninogenica*، ۳/۵ برابری *Prevotella pallens*، ۲/۶۷ برابری *Actinobacillus parahaemolyticus*، ۲/۴ برابری *Veillonella parvula*، ۱۱/۶ برابری *Aggregatibacter segnis* و ۱/۵ برابری *Neisseria subflava* در مصدومین شیمیایی دارد. از سوی دیگر گونه‌هایی مانند *R. aeria* (۵/۵ برابر)، *Asticcacaulis biprosthecium* (۲/۴۳ برابر)، *R. dentocariosa* (۳/۸۴ برابر)، *Selenomonas noxia* (۱۴/۷ برابر)، *P. tanneriae* (۵/۵ برابر) و *Wolbachia Wolbachia* (۲/۴ برابر) در گروه کنترل با فراوانی بیشتری در مقایسه با گروه مصدومین شیمیایی دیده شدند.

بحث

نتایج توالی‌یابی ژن مارکر rRNA ۱۶S نشان داد که جمعیت میکروبی‌های کلونیزه شده در ریه مصدومین شیمیایی متمایز از جمعیت میکروبی است که به طور طبیعی در ریه دیده می‌شوند. بررسی شاخص‌های تنوع میکروبی نیز تفاوت‌هایی بین جمعیت میکروبی‌های موجود در ریه مصدومین شیمیایی در مقایسه با افراد سالم نشان می‌دهد. به طوری که شاخص Chao1 که برآوردی از میزان غنای میکروبی است به طور معنی‌داری در گروه مصدومین شیمیایی در مقایسه با افراد سالم افزایش نشان می‌دهد. بر اساس شاخص‌های تنوع بتا نیز جمعیت میکروبی موجود در ریه مصدومین شیمیایی چه از نظر فراوانی نسبی و چه از نظر قرابت خویشاوندی متمایز از میکروبی‌های موجود در فلور طبیعی ریه هستند. در بیماری‌های دیگری مانند سیستمیک فیبروزیز کاهش تنوع میکروبی در بخش‌های تحتانی ریه با افزایش سن و کاهش عملکرد ریه ارتباط نشان می‌دهد (۲۳). اما مطالعه میکروبیوم راه‌های هوایی ریه در افراد بالغ و بچه‌های مبتلا به آسم حکایت از تشابه میکروبیوم در بین افراد سالم و بیمار دارد (۵).

بیشتر میکروبی‌هایی که در ریه مصدومین شیمیایی دیده می‌شوند به طور طبیعی جزئی از فلور میکروبی ریه محسوب می‌شوند اما تغییر در فراوانی آنها در بسیاری از موارد توأم با مشکلاتی مانند التهاب می‌شود. نقش میکروبیوم ریه به عنوان واسطه‌های التهابی اخیراً مشخص شده است (۱۲)، به طوری که در حضور برخی از میکروبی‌های پنوموکوک التهاب آلوئولارها اتفاق می‌افتد (۱۴، ۲۴). پژوهش‌های پیشین نقش میکروبیوم ریه در سلامت انسان را در بیماری‌های مزمن ریوی از قبیل آسم، سیستمیک فیبروزیز و COPD تایید نموده‌اند (۸-۱۰). این که به چه میزان

نرمال را به خود اختصاص می‌دهند. در بین خانواده‌های باکتریایی غالب، تنها فراوانی خانواده *Prevotellaceae* که در گروه مصدومین شیمیایی حدود ۲/۵ برابر بیشتر از گروه کنترل است (۱۸/۵ درصد در برابر ۷/۳ درصد) از نظر آماری اختلاف معنی‌دار دیده شد ($p = 0.004$) که دلالت بر اهمیت و ارتباط آنها با وضعیت سلامت بیماران دارد. از دیگر خانواده‌های باکتریایی که اختلاف فراوانی آنها در گروه مصدومین شیمیایی در مقایسه با افراد سالم از نظر آماری معنی‌دار است ($p < 0.05$) می‌توان به خانواده‌های *Lachnospiraceae*، *Coriobacteriaceae*، *Thermomonosporaceae* و *Leptotrichiaceae* اشاره کرد. از بین این خانواده‌ها، *Lachnospiraceae*، *Coriobacteriaceae* و *Leptotrichiaceae* در مصدومین شیمیایی افزایش نشان می‌دهند در صورتی که *Thermomonosporaceae* حدود ۱۵ برابر فراوانی بیشتری در گروه کنترل نسبت به گروه مصدومین شیمیایی دارند (۰/۰۰۷ درصد در برابر ۰/۰۰۴).

در مجموع حدود ۴۶۰ جنس باکتریایی در ریه مصدومین شیمیایی و افراد سالم شناسایی شد که از این تعداد گونه‌های متعلق به ۹ جنس در گروه مصدومین شیمیایی در مقایسه با افراد کنترل اختلاف فراوانی معنی‌دار نشان می‌دهند ($p < 0.05$). این جنس‌ها به ترتیب فراوانی شامل *Prevotella*، *Leptotrichia*، *Atopobium*، *Aggregatibacter*، *Catonella*، *Oribacterium*، *Leptotrichiaceae* unclassified و *Pirellulaceae* unclassified می‌شوند. در گروه مصدومین شیمیایی در مقایسه با گروه کنترل، گونه‌های مربوط به جنس‌های *Prevotella*، *Leptotrichia*، *Atopobium*، *Aggregatibacter*، *Catonella* و *Oribacterium* به ترتیب ۲/۵، ۳، ۲/۵، ۹/۷، ۴/۶ و ۳/۳ برابر افزایش فراوانی نشان می‌دهند ($p < 0.05$). در حالی که تنها گونه‌های متعلق به جنس‌های *unclassified Pirellulaceae* و *unclassified Chloroflexi* به ترتیب ۱۲/۴ و ۱۴/۷ برابر در گروه مصدومین در مقایسه با گروه کنترل کاهش فراوانی نشان می‌دهند ($p < 0.05$).

از بین ۳۴۶۱ OTUs دیده شده در عمق خوانش ۱۱۸۹۰ تنها ۶۲۶ OTUs در سطح تاکسونومی گونه (species) شناسایی شدند. این OTUs در مجموع به ۶۵ گونه ساخته شده باکتریایی نسبت داده شدند. بقیه OTU ها یا به هیچ شاخه تاکسونومیکی نسبت داده نشدند (unassigned) و یا حداکثر تا سطح جنس شناسایی شدند. از بین گونه‌های شناسایی شده، *Prevotella melaninogenica*، *Veillonella dispar*، *Neisseria Rothia*، *Porphyromonas endodontalis*، *cinerea*، *Haemophilus parainfluenzae*، *mucilaginoso*، *Pyramidobacter piscoleus*، *Prevotella tanneriae*، *Prevotella nanceiensis*، *Rothia dentocariosa* و *Rothia aeria* با فراوانی بالایی در میکروبیوم ریه دیده شدند. برای مثال *V. dispar* در گروه مصدومین ۹/۳ درصد و در گروه کنترل ۹/۶ درصد، *N. cinerea* در مصدومین شیمیایی به طور متوسط ۲/۴ درصد و در گروه کنترل ۲/۷ درصد، *P. endodontalis* در

دارد. ارتباط بین حضور گونه‌های مربوط به این جنس و افزایش خطر ابتلا به آسم در کودکان مشخص شده است (۲۷). حضور این گونه‌های بیماری‌زا ممکن است منجر به افزایش التهاب راه‌های هوایی شود (۵)، که در واقع یکی از مشکلات ریوی بارز در مصدومین شیمیایی است. در بیماران COPD افزایش فراوانی *Haemophilus*، *Moraxella* و *Acinetobacter* به وفور دیده می‌شود (۷، ۲۸). افزایش ۲/۴ برابری *V. parvula* در گروه مصدومین شیمیایی در مقایسه با افراد سالم ارتباط این میکروب‌ها با وضعیت بیماری مصدومین شیمیایی را نشان می‌دهد. در مطالعات قبلی نیز افزایش فراوانی گونه‌های *Veillonella* در میکروبیوم افراد سیگاری و بیماران با فیبروز ریوی آیدیوپاتیک مشخص شده است (۱۱، ۲۹). با وجود اینکه افزایش جمعیت آنها توأم با مارکرهای التهابی در ریه است اما ارتباط آنها با التهاب راه‌های هوایی هنوز به طور کامل مشخص نشده است (۱۴). میکروفلور طبیعی موجود در حلق، روده‌ها و ریه شناخته می‌شوند و به طور گسترده در عفونت‌های دستگاه تنفسی نیز دیده می‌شوند (۳۰).

بررسی‌های انجام گرفته بر روی افراد مبتلا به COPD و یا آسم که تظاهرات بالینی مشابهی با مصدومین شیمیایی نشان می‌دهند حکایت از تغییرات قابل توجه در سطح میکروبیوم ریه دارد که از اصلی‌ترین آنها می‌توان به کاهش فراوانی نسبی جنس *Prevotella*، متعلق به شاخه *Bacteroidetes*، در مقایسه با افراد سالم اشاره نمود (۷).

در این مطالعه اما در گروه مصدومین شیمیایی افزایش فراوانی *Prevotella* دیده شد که بیانگر ارتباط آنها با نارسایی‌های ریوی در این گروه از بیماران است. با توجه به این نتایج می‌توان گفت که افزایش و یا کاهش نسبی *Prevotella* از یک سطح مشخص می‌تواند با تغییراتی در شرایط بالینی و مشخصاً کیفیت تنفسی بیماران در ارتباط باشد. *Prevotella* ها باکتری‌های گرم منفی هستند که به عنوان بخشی از میکروفلور طب

جمعیت این باکتری‌ها در ریه بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروز نیز افزایش قابل توجهی نشان می‌دهد (۳۱). در افراد مبتلا به التهاب ریه افزایش فراوانی *Prevotella* ها در راه‌های هوایی تحتانی توأم با افزایش مارکرهای التهابی است (۱۴).

این یافته با توجه به اینکه این گونه‌های باکتریایی جزء باکتری‌های دستگاه گوارش و دهان محسوب می‌شوند و میکروب‌های سیستم گوارش اغلب باعث ایجاد التهاب در دستگاه تنفسی می‌شوند قابل توجیه است (۱۴).

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که میکروبیوم ریه در مصدومین شیمیایی در مقایسه با افراد سالم تفاوت زیادی نشان می‌دهد. افزایش فراوانی باکتری‌های متعلق به جنس‌های *Veillonella*، *Neisseria* و *Prevotella* در ریه مصدومین شیمیایی و ارتباط آنها

میکروب‌های کلونیزه شده در ریه مصدومین شیمیایی در مشکلات ریوی آنها نقش دارند اطلاعاتی در دسترس نیست. آنچه مسلم است این است که میکروبیوم ریه نقش کلیدی در سلامت انسان ایفا می‌کند و بنابراین انتظار می‌رود با وجود نارسایی‌های گسترده در ریه مصدومین شیمیایی نقش جمعیت میکروب‌های همزیست در ریه این افراد با وضعیت بیماری آنها بی‌ارتباط نباشد. بنابراین در مطالعه حاضر با بررسی جمعیت باکتریایی ساکن در ریه مصدومین شیمیایی از طریق روش‌های متازنومیکس به ماهیت و ترکیب میکروبیوم موجود در ریه آنها دسترسی پیدا کردیم و در نهایت با مقایسه فراوانی میکروبیوم در این گروه از بیماران با افراد سالم شواهدی مبنی بر تغییرات میکروبیوم و ارتباط آن با وضعیت بیماری مصدومین شیمیایی مشاهده شد.

گونه‌های غالب دیده شده در میکروبیوم ریه مصدومین شیمیایی و افراد سالم مربوط به شاخه‌های *Firmicutes*، *Bacteroidetes* و *Proteobacteria* بودند که در مجموع بخش قابل توجهی از جمعیت میکروبیوم ساکن ریه را به خود اختصاص می‌دهند. این یافته با مشاهدات قبلی نیز در انطباق است (۱۳، ۲۵). با وجود اینکه شاخه *Bacteroidetes* با فراوانی بسیار بیشتری در نمونه‌های مصدومین شیمیایی دیده شد، اما این تفاوت‌ها از نظر آماری معنی‌دار نیست که نشان از واریانس بالای تغییرات در افراد گروه کنترل و بیماران دارد. از طرف دیگر *Proteobacteria* در گروه مصدومین شیمیایی در مقایسه با گروه کنترل فراوانی کمتری دارند (۲۱٪ در برابر ۲۷٪).

جامعه میکروبی ساکن ریه مصدومین شیمیایی را میکروب‌هایی از گروه باکتری‌هایی که به طور غالب در جمعیت میکروبی ریه افراد سالم و افراد با بیماری‌های ریوی مانند آسم و COPD دیده می‌شوند تشکیل می‌دهند. از جمله می‌توان به گونه‌های مربوط به جنس‌های *Prevotella*، *Haemophilus*، *Veillonella*، *Porphyromonas* و *Rothia* اشاره کرد. باکتری‌های متعلق به شاخه *Proteobacteria* شامل جنس‌های *Haemophilus* و *Moraxella* در میکروبیوم ریه بیماران مبتلا به COPD و آسم به وفور دیده می‌شوند (۵).

یافته‌های بدست آمده از مطالعه میکروبیوم ریه در بیماران COPD حکایت از تشابه میکروبیوم در افراد بیمار و سالم دارد با این تفاوت که گونه‌های متعلق به *Proteobacteria* با فراوانی بیشتری در میکروبیوم ریه بیماران COPD دیده می‌شوند (۷). ارتباط بین افزایش جمعیت *Proteobacteria* و آسم در کودکان نیز به خوبی نشان داده شده است (۵). افزایش فراوانی *Firmicutes* ها قبلاً در بیماران COPD دیده شده است که بیشتر بواسطه افزایش فراوانی گونه‌های متعلق به جنس *Lactobacillus* می‌باشد (۲۶، ۸).

افزایش فراوانی گونه‌های *Neisseria* در گروه مصدومین شیمیایی حکایت از نقش آنها در مشکلات ریوی این گروه از بیماران

نکات بالینی کاربردی برای جوامع نظامی

- کنترل جمعیت میکروب‌هایی که فراوانی آنها با التهاب راه‌های هوایی ریه ارتباط نشان می‌دهد می‌تواند در جهت کاهش نارسایی‌های ریوی در مصدومین شیمیایی موثر واقع شود.
- استفاده گسترده از آنتی بیوتیک‌های وسیع الطیف می‌تواند منجر به از بین رفتن تعادل بین جمعیت میکروارگانیسم‌های مفید و پاتوژن‌های بیماری‌زا در ریه شود.

تشکر و قدردانی: این مطالعه بخشی از رساله

کارشناسی ارشد آقای مهیار شریف باقری است که در قالب طرح پژوهشی با کد ۹۱۰۰۲۱۱۹ در سال ۱۳۹۵ در مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی به تصویب رسیده است. لازم است از پرسنل و همکاران بخش برونکوسکوپی بیمارستان بقیه الله (عج) که امکان نمونه برداری را فراهم کردند تشکر و قدردانی کنیم.

نقش نویسندگان: ارائه ایده و طرح اولیه : قره چاهی،

جمع‌آوری داده‌ها: شریف باقری و قزوینی، تکمیل پرسشنامه‌ها: شریف باقری، معاینه بیمار: قزوینی، تحلیل و تفسیر داده‌ها: شریف باقری، قره چاهی و تولایی. همه نویسندگان در نگارش اولیه مقاله یا بازنگری آن سهیم بودند و همه با تایید نهایی مقاله حاضر، مسئولیت دقت و صحت مطالب مندرج در آن را می‌پذیرند.

منابع:

1. Ghanei M, Harandi AA. Molecular and cellular mechanism of lung injuries due to exposure to sulfur mustard: a review. *Inhal Toxicol.* 2011;23(7):363-71. doi:10.3109/08958378.2011.576278
2. Ghanei M, Harandi AA. Long term consequences from exposure to sulfur mustard: a review. *Inhal Toxicol.* 2007;19(5):451-6. doi:10.1080/08958370601174990
3. Ghanei M, Fathi H, Mohammad MM, Aslani J, Nematizadeh F. Long-term respiratory disorders of claimers with subclinical exposure to chemical warfare agents. *Inhal Toxicol.* 2004;16(8):491-5. doi:10.1080/08958370490442421
4. Ghanei M, Mokhtari M, Mohammad MM, Aslani J. Bronchiolitis obliterans following exposure to sulfur mustard: chest high resolution computed tomography. *Eur J Radiol.* 2004;52(2):164-9. doi:10.1016/j.ejrad.2004.03.018
5. Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, et al. Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One.* 2010;5(1):e8578. doi:10.1371/journal.pone.0008578
6. Charlson ES, Bittinger K, Haas AR, Fitzgerald AS, Frank I, Yadav A, et al. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184(8):957-63. doi:10.1164/rccm.201104-0655OC
7. Cabrera-Rubio R, Garcia-Nunez M, Seto L, Anto JM, Moya A, Monso E, et al. Microbiome diversity in the bronchial tracts of patients with chronic

با التهاب راه‌های هوایی نشان دهنده نقش موثر آنها در مشکلات ریوی مصدومین شیمیایی است.

با انجام مطالعات بیشتر بر روی میکروبیوم دستگاه تنفسی این افراد می‌توان الگوی دقیق تری از جمعیت باکتریایی کلونیزه شده در ریه آنها ترسیم کرد و با بررسی تفاوت‌های میکروبیوم ریه آنها با افراد سالم ارتباط موثری بین تغییرات دیده شده با شرایط بالینی بیماراران ایجاد کرد.

این یافته‌ها می‌توانند در زمینه پروبیوتیک درمانی و یا اتخاذ روش‌های درمانی دقیق تر و آگاهانه تر راه گشا باشند.

اما این نکته را نیز نباید نادیده گرفت که عمل نمونه‌گیری به روش برونکوسکوپی یک عمل بسیار دشوار است و نمی‌توان به سهولت بیمار را متقاعد به انجام آن کرد و این مسئله اصلی‌ترین مشکل سد راه اینگونه مطالعات می‌باشد. مطالعه میکروبیوم موجود در نمونه خلط و یا ترشحات حلقی را می‌توان به عنوان روش جایگزین پیشنهاد کرد.

تضاد منافع: نویسندگان تصریح می‌کنند که هیچ گونه تضاد

منافعی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

- obstructive pulmonary disease. *J Clin Microbiol.* 2012;50(11):3562-8. doi:10.1128/JCM.00767-12
8. Kim HJ, Kim YS, Kim KH, Choi JP, Kim YK, Yun S, et al. The microbiome of the lung and its extracellular vesicles in nonsmokers, healthy smokers and COPD patients. *Exp Mol Med.* 2017;49(4):e316. doi:10.1038/emm.2017.7
9. Frayman KB, Armstrong DS, Carzino R, Ferkol TW, Grimwood K, Storch GA, et al. The lower airway microbiota in early cystic fibrosis lung disease: a longitudinal analysis. *Thorax.* 2017;72(12):1104-12. doi: 10.1136/thoraxjnl-2016-209279
10. Chung KF. Airway microbial dysbiosis in asthmatic patients: A target for prevention and treatment? *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139(4):1071-81. doi:10.1016/j.jaci.2017.02.004
11. Molyneux PL, Cox MJ, Wells AU, Kim HC, Ji W, Cookson WO, et al. Changes in the respiratory microbiome during acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res.* 2017;18(1):29. doi:10.1186/s12931-017-0511-3
12. Scher JU, Joshua V, Artacho A, Abdollahi-Roodsaz S, Ockinger J, Kullberg S, et al. The lung microbiota in early rheumatoid arthritis and autoimmunity. *Microbiome.* 2016;4(1):60. doi:10.1186/s40168-016-0206-x
13. Dickson RP, Huffnagle GB. The Lung Microbiome: New Principles for Respiratory Bacteriology in Health and Disease. *PLoS Pathog.* 2015;11(7):e1004923. doi:10.1371/journal.ppat.1004923

14. Segal LN, Alekseyenko AV, Clemente JC, Kulkarni R, Wu B, Chen H, et al. Enrichment of lung microbiome with supraglottic taxa is associated with increased pulmonary inflammation. *Microbiome*. 2013;1(1):19. doi:10.1186/2049-2618-1-19
15. Byun MK, Chang J, Kim HJ, Jeong SH. Differences of lung microbiome in patients with clinically stable and exacerbated bronchiectasis. *PLoS One*. 2017;12(8):e0183553. doi:10.1371/journal.pone.0183553
16. Zemanick ET, Sagel SD, Harris JK. The airway microbiome in cystic fibrosis and implications for treatment. *Curr Opin Pediatr*. 2011;23(3):319-24. doi:10.1097/MOP.0b013e32834604f2
17. Beck JM, Young VB, Huffnagle GB. The microbiome of the lung. *Transl Res*. 2012;160(4):258-66. doi:10.1016/j.trsl.2012.02.005
18. Hang J, Zavaljevski N, Yang Y, Desai V, Ruck RC, Macareo LR, et al. Composition and variation of respiratory microbiota in healthy military personnel. *PLoS One*. 2017;12(12):e0188461. doi:10.1371/journal.pone.0188461
19. Magoc T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*. 2011;27(21):2957-63. doi:10.1093/bioinformatics/btr507
20. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 2010;7(5):335-6. doi:10.1038/nmeth.f.303
21. Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahe F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *Peer J*. 2016;4:e2584. doi:10.7717/peerj.2584
22. Gharechahi J, Kharazian ZA, Sarikhan S, Jouzani GS, Aghdasi M, Hosseini Salekdeh G. The dynamics of the bacterial communities developed in maize silage. *Microb Biotechnol*. 2017;10(6):1663-76. doi:10.1111/1751-7915.12751
23. Cox MJ, Allgaier M, Taylor B, Baek MS, Huang YJ, Daly RA, et al. Airway microbiota and pathogen abundance in age-stratified cystic fibrosis patients. *PLoS One*. 2010;5(6):e11044. doi:10.1371/journal.pone.0011044
24. Segal LN, Clemente JC, Tsay JC, Korolov SB, Keller BC, Wu BG, et al. Enrichment of the lung microbiome with oral taxa is associated with lung inflammation of a Th17 phenotype. *Nat Microbiol*. 2016;1:16031. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.31
25. Wang J, Li F, Tian Z. Role of microbiota on lung homeostasis and diseases. *Sci China Life Sci*. 2017;60(12):1407-15. doi:10.1007/s11427-017-9151-1
26. Sze MA, Dimitriu PA, Hayashi S, Elliott WM, McDonough JE, Gosselink JV, et al. The lung tissue microbiome in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185(10):1073-80. doi:10.1164/rccm.201111-2075OC
27. Bisgaard H, Hermansen MN, Buchvald F, Loland L, Halkjaer LB, Bonnelykke K, et al. Childhood asthma after bacterial colonization of the airway in neonates. *N Engl J Med*. 2007;357(15):1487-95. doi:10.1056/NEJMoa052632
28. Erb-Downward JR, Thompson DL, Han MK, Freeman CM, McCloskey L, Schmidt LA, et al. Analysis of the lung microbiome in the "healthy" smoker and in COPD. *PLoS One*. 2011;6(2):e16384. doi:10.1371/journal.pone.0016384
29. Morris A, Beck JM, Schloss PD, Campbell TB, Crothers K, Curtis JL, et al. Comparison of the respiratory microbiome in healthy nonsmokers and smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187(10):1067-75. doi:10.1164/rccm.201210-1913OC
30. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*. 2005;43(11):5721-32. doi:10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005
31. Tunney MM, Field TR, Moriarty TF, Patrick S, Doering G, Muhlebach MS, et al. Detection of anaerobic bacteria in high numbers in sputum from patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177(9):995-1001. doi:10.1164/rccm.200708-1151OC