

# آنالیز ژنومیک مولکول C-fos در دیواره راه‌های هوایی بیماران مبتلا به COPD در پی افزایش رادیکال‌های آزاد پس از مواجهه با گاز خردل

سمانه یزدانی<sup>۱</sup>، محمدحسن کریم‌فر<sup>۲</sup>، عباسعلی ایمانی فولادی<sup>۳</sup>، محمدرضا نورانی<sup>۴\*</sup>

<sup>۱</sup> کارشناس ارشد بیوشیمی، مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، دکتری علوم تشریح، دانشیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، <sup>۲</sup> دکتری میکروبیولوژی، استادیار، مرکز تحقیقات فرآورده‌های میکروبی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، <sup>۳</sup> دکتری بیولوژی سلولی، استادیار، مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)

\* نویسنده پاسخگو: Email: r.nourani@yahoo.com

چکیده:

هدف: اپی‌تلیوم راه هوایی به عنوان سد فیزیولوژیکی بدن به مبارزه با عوامل مخاطره‌زای بیرونی در بیماری‌های ریوی از جمله بیماری ریوی انسدادی مزمن (COPD) می‌پردازد و به نظر می‌رسد این مکانیسم از طریق تغییرات در بیان ژن‌های درگیر در التهاب صورت می‌گیرد. رادیکال‌های آزاد اکسیژن که نقش مهمی در بیان پروتئین‌های التهابی دارند، از طریق فعال شدن فاکتور رونویسی پروتئین فعال‌کننده نوع (AP-1) سبب رونویسی ژن‌های سیتوکین و ژن‌های التهابی می‌شوند. سولفور موستارد نیز به عنوان یک عامل مخاطره‌زای بیرونی به طور مشابه سبب افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود. با توجه به گستردگی سیتوکین‌ها و پروتئین‌های التهابی، بر آن شدیم تا بیان فاکتور رونویسی سیتوکین‌ها و پروتئین‌های التهابی را به دنبال افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن پس از مواجهه با سولفور موستارد بررسی کنیم و برای این منظور از متداولترین منومر فاکتور رونویسی AP-1 یعنی C-fos استفاده کردیم.

مواد و روش‌ها: بیان ژن C-fos در ۲۰ نمونه مصدوم شیمیایی و ۱۰ نمونه کنترل مورد بررسی قرار گرفت. پس از استخراج mRNA از سلول‌های راه‌هوایی، از mRNA تخلیص شده، cDNA ساخته شد و بیان ژن C-fos مورد بررسی قرار گرفت. به منظور مطالعه میزان افزایش بیان ژن C-fos در نمونه‌های شیمیایی نسبت به کنترل، از تکنیک Real-Time PCR استفاده شد. یافته‌ها: نتایج نشان داد بیان ژن C-fos در دیواره راه‌های هوایی مصدومین شیمیایی نسبت به افراد کنترل به دنبال مواجهه با سولفور موستارد افزایش می‌یابد اما این افزایش بیان در سطح mRNA با توجه نتایج به دست آمده از تحلیل آماری معنی‌دار نیست ( $p > 0.05$ ).

بحث: بررسی‌های فوق نشان داد بیان ژن C-fos در دیواره راه‌های هوایی مصدومین شیمیایی افزایش یافته‌است و این افزایش بیان ممکن است به دنبال افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن پس از مواجهه با سولفور موستارد باشد اما این افزایش بیان چشمگیر نیست و این امر ممکن است به دلیل کاهش سطح آنتی‌اکسیدان‌ها که یک فعال‌کننده بارز AP-1 هستند، باشد.

کلید واژه: دیواره راه‌های هوایی، سولفور موستارد، رادیکال‌های آزاد اکسیژن، پروتئین فعال‌کننده نوع (AP-1)، C-fos.

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۸/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱/۲۲

## مقدمه

ژن‌ها به طور وسیعی در انواع سلول‌ها و بافت‌ها بیان می‌شوند.

فعالیت AP-1 به‌وسیله تنوعی از تحریکات فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی شامل سیتوکین‌ها، فاکتورهای رشد، پیام استرس نظیر رادیکال‌های آزاد اکسیژن (۲۵ و ۹ و ۶ و ۱)، سم، تحریکات میتوزن (۵)، عفونت و تحریکات انکوژنی تنظیم می‌شود (۷). ناحیه پرموتر بسیاری از سیتوکین‌های التهابی و کموکین‌ها حاوی جایگاه‌های اتصال به AP-1 هستند و این امر بیانگر این مطلب است که فعال شدن AP-1 ممکن است در القاء التهاب ایجاد شده به‌وسیله سیتوکین‌ها ضروری باشد (۵). براین اساس حضور AP-1 در دیواره راه‌های هوایی به دنبال مواجهه با ذرات محیطی به اثبات رسیده است.

یکی از این عوامل مخاطره‌زای بیرونی، سولفور موستارد یا گاز خردل با فرمول شیمیایی  $\text{C}_2\text{H}_4\text{S}_2$  و بیس کلرو اتیل سولفید (۱۲-۱۰) می‌باشد که طی جنگ تحمیلی بارها توسط رژیم بعثی عراق استفاده شد (۱۴ و ۱۳) و در پی آن تعداد زیادی از رزمندگان و افراد ساکن در برخی شهرهای مرزی ایران از جمله سردشت متحمل تأثیرات سوء این گاز شدند. در حال حاضر هزاران مصدوم شیمیایی به‌جا مانده از این جنگ از ضایعات ریوی ناشی از این گاز به ویژه COPD رنج می‌برند (۱۸-۱۵). به دنبال تماس با این گاز سطح ROS در این بیماران نیز افزایش می‌یابد (۲۰ و ۱۹)، اما مکانیسم آسیب مولکولی این ترکیب پس از افزایش ROS هنوز کاملاً مشخص نیست. با توجه به گستردگی سیتوکین‌ها، برآن شدیم تا ابتدا حضور فاکتور رونویسی کدکننده این ترکیبات را بررسی کنیم و برای این منظور از متداولترین و مهم‌ترین منومر AP-1 یعنی C-fos استفاده کردیم.

## مواد و روش‌ها

## برونکوسکوپی و جمع‌آوری نمونه

نمونه‌های مورد نیاز برای این مطالعه بیوپسی دیواره راه‌های هوایی بودند که از بخش برونکوسکوپی مجتمع بیمارستانی بقیه‌الله الاعظم (عج) جمع‌آوری شدند. پس از کسب موافقت کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه بقیه‌الله (عج) از تمامی شرکت‌کنندگان در این مطالعه، رضایت‌نامه کتبی گرفته شد. شرکت‌کنندگان در این طرح به دو گروه تقسیم شدند:

اپی‌تلیوم راه هوایی اولین سد فیزیولوژیکی بدن در برابر عوامل مخاطره‌زای بیرونی نظیر آلرژن‌ها، ذرات صنعتی، آلاینده‌های محیطی و عوامل عفونت‌زاست. برهم کنش‌های فیزیولوژیکی دفاعی که در راه‌های هوایی در پاسخ به ذرات تنفسی اتفاق می‌افتد، در التهاب راه‌های هوایی و بیماری‌های ریوی نقش دارند. گرچه مکانیسم دقیق این استراتژی دفاعی که سبب بیماری‌های التهابی راه‌های هوایی نظیر بیماری ریوی انسدادی مزمن (COPD) می‌شود، هنوز کاملاً مشخص نشده است، اما به نظر می‌رسد تغییرات در بیان ژن‌های درگیر در التهاب و در نهایت بیان محصولات آن‌ها، نقش مهمی را در این فرایند ایفا می‌کند (۱).

رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) نقطه حیاتی در مسیر کنترل‌کننده بیان پروتئین‌های ایجادکننده التهاب می‌باشند. تعادل سلولی ممکن است در مواجهه با رادیکال‌های آزاد اکسیژن تغییر کند و برای ایجاد تعادل سلولی در این شرایط، سلول با تولید مولکول‌های پیام‌رسان جدید که توانایی آغاز رونویسی ژن‌ها را دارند، رونویسی برخی ژن‌ها را موجب می‌شود. مهم‌ترین این مولکول‌ها فاکتور رونویسی با نام پروتئین فعال‌کننده نوع ۱ (AP-1) می‌باشد (۲ و ۱). فعال شدن AP-1 منجر به القای ژن‌های سیتوکین و واسطه‌های ایجادکننده التهاب می‌شود و بر این اساس مولکول AP-1 یک فاکتور حساس به رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشد (۲).

P-1 تنظیم‌کننده مهم در رشد سلولی، تمایز، تغییر شکل، تکثیر (۳)، انکوژنز (۴) و آپوپتوز (Mukhopadhyay, S, et al. 2008) است. اعضای تشکیل‌دهنده پروتئین AP-1 شامل پروتئین‌های خانواده Fos یعنی Fos-B, C-fos, Fra-1 و Fra-2، پروتئین‌های خانواده Jun نظیر Jun, C-Jun, Jun-B و Jun-D (۵ و ۶) اعضای خانواده فاکتور رونویسی فعال‌کننده یعنی ATF-a, ATF-2 و ATF-3 (۷ و ۶) و زیرخانواده JDP شامل JDP-1 و JDP-2 می‌باشند. وجه مشترک تمام این پروتئین‌ها دومین زیپ‌لوسین حفظ شده است. درواقع زیپ‌لوسین مسئول دایمرشدن این پروتئین‌هاست که شرط لازم برای اتصال به DNA می‌باشد (۷ و ۸). همچنین مسئول پایداری و اختصاصی بودن همودایمر و هتروداایمرهای ایجاد شده به‌وسیله پروتئین‌های Fos و Jun است. پروتئین کدشده توسط این

به‌منظور ساخت cDNA به وسیله آنزیم ترنس‌کریپتاز معکوس موجود در کیت (CycleScript RT PreMix (Bioneer, Korea), (dN6) مورد استفاده قرار گرفت و cDNA به دست‌آمده از نسخه‌برداری معکوس به عنوان الگو برای PCR مورد استفاده قرار گرفت. به‌منظور انجام PCR، پرایمرهای ژن C-fos و بتاکتین (به عنوان یک ژن خانه‌دار و برای نرمال‌سازی بیان ژن‌ها) طراحی شدند و برای بررسی اختصاصی بودن هر یک از پرایمرها، همولوژی کامل پرایمر مورد نظر با ژن مذکور توسط نرم‌افزار BLAST تأیید گردید. جدول شماره ۱ توالی پرایمرهای مذکور به همراه دمای اتصال و تعداد نوکلئوتیدها را نشان می‌دهد. شرایط دمایی PCR شامل مراحل زیر بود: ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۳ سیکل با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد جدا شده و

۱- اشخاص مبتلا به COPD که سابقه مواجهه با سولفور موستارد را در جنگ تحمیلی داشتند. متخصصین ریه با استفاده از یافته‌های اسپرومتری و HRTC و بالینی، بیماران را انتخاب و به مطالعه وارد می‌شدند. تعداد این بیماران ۲۰ نفر بود.

۲- افراد کنترل که به دلایل بالینی و به تشخیص پزشک معالج تحت عمل برونکوسکوپی قرار می‌گرفتند ولی پس از برونکوسکوپی هیچ‌گونه عارضه شناخته‌شده‌ی ریوی را نشان نمی‌دادند. همچنین عکس‌های ریوی (اسکن ریه) این افراد نیز بیانگر عارضه‌ای مشخص در ریه آن‌ها نبود. ۱۰ نمونه به عنوان کنترل نیز از این گروه جمع‌آوری شد.

به‌منظور بررسی اثرات سولفور موستارد در نمونه‌های بیوپسی ریه، کسانی که سابقه بیماری‌های ریوی پیش از مواجهه با این گاز را داشتند، افراد مسن، معتادین، افراد سیگاری و بیماران مبتلا به سل از این مطالعه حذف شدند. نمونه‌های بیوپسی به‌وسیله پنس بیوپسی و توسط پزشک فوق تخصص ریه از محل ضایعه برداشته شد. پیش

جدول ۱: پرایمرهای طراحی شده برای بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه

GENES	Primer sequences (5-3)	Tempreture Annealing	Size (bp)
C-fos (NM_003367)	5'-GTGATCCAAAATCCCTTCAGC-3'	60°C	210bp
	5'-GATCGTCTCTGTGTTCCTG-3'		
Bactin (NM_001101)	5'-TTCTACAATGAGCTGCGTGTGG-3'	59°C	190bp
	5'-GTGTTGAAGTCTCAAACATGAT-3'		

پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید توسط دستگاه UV قابل شناسایی شدند. به منظور بررسی میزان افزایش بیان در نمونه‌ها از تکنیک Real-time PCR و آنزیم (Master Mix SYBER GREENAB, Takara, Japan) استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌های PCR از SPSS13 استفاده شد. بر این اساس برای مقایسه بیان ژن C-fos در نمونه‌های کنترل و شیمیایی از آزمون آماری T-test استفاده شد. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  نحراف معیار گزارش شد و P-value کمتر از ۰.۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

از عمل برونکوسکوپی، راه‌های هوایی فوقانی با استفاده از لیدوکائین ۲ درصد بی‌حس شد و پس از نمونه‌گیری، نمونه‌های مورد نظر در محلول تخلیص RNA (Tripure RNA Isolation Reagent (Roche applied science, Germany)) قرار گرفته و بلافاصله به فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

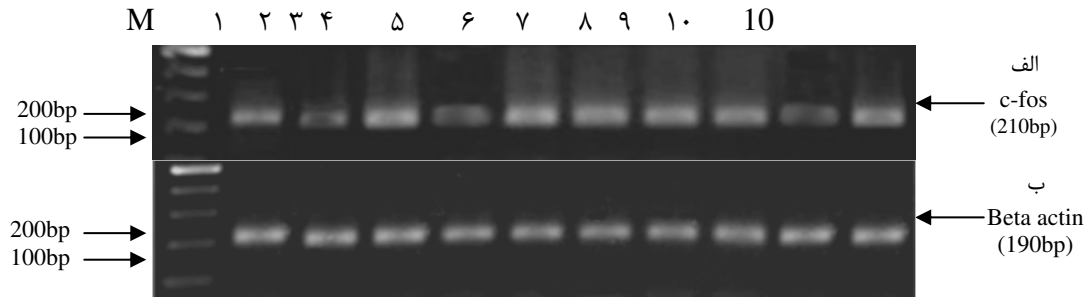
#### تخلیص RNA و نسخه‌برداری معکوس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

پس از هموژن کردن بافت بیوپسی توسط هموژنایزر (Heidolph, SilentCrusher, German) RNA تام سلولی با استفاده از محلول تخلیص RNA و طبق پروتکل استخراج شد. میزان RNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفوتومتر نانودراپ (NanoDrop, ND1000) سنجیده شد. مقدار ۳۰۰ نانوگرم از RNA تام سلولی

## یافته‌ها

افراد کنترل تا حدودی افزایش یافته‌است. شکل ۱ الف بیان این ژن را در نمونه‌های مذکور نشان می‌دهد. برای این منظور از ژن بتا اکتین به عنوان ژن کنترل استفاده شد و نتایج حاصل از آن هیچ‌گونه تفاوتی را در بیان این ژن در نمونه‌های کنترل و شیمیایی نشان‌نداد (شکل ۱ ب).

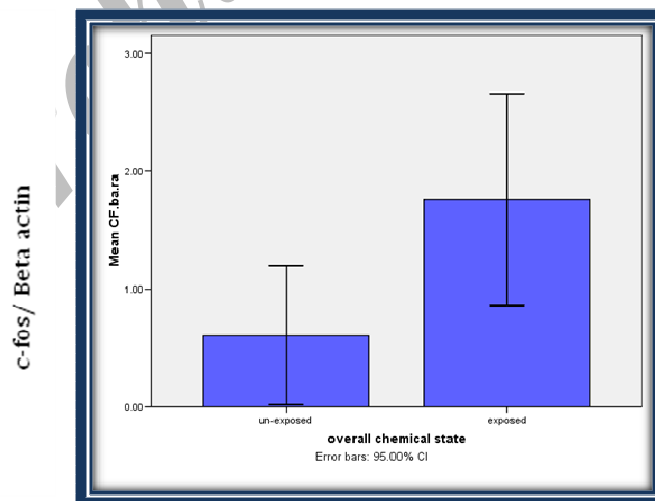
در این مطالعه ۲۰ مصدوم شیمیایی مبتلا به بیماری COPD و ۱۰ نمونه کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. بیان ژن C-fos ابتدا توسط روش PCR در این نمونه‌ها ارزیابی شد. نتایج حاصل از PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد نشان‌داد بیان این ژن در مصدومین شیمیایی نسبت به



شکل ۱. نتایج حاصل از PCR ژن c-fos نمونه‌های کنترل در مقایسه با نمونه‌های شیمیایی را نشان می‌دهد. در چاهک M ۳ میکرولیتر از شاخص اندازه ملکولی ۱۰۰ جفت باز (غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر) ران شده‌است. چاهک شماره ۱ و ۲ ژن‌های c-fos نمونه‌های کنترل و چاهک‌های ۳ تا ۱۰ نمونه‌های بیماران را نشان می‌دهد که مشاهده می‌شود بیان این ژن در بیماران نسبت به نمونه‌های کنترل تا حدی افزایش یافته‌است. ب) الکتروفورز نتایج PCR ژن بتا اکتین از نمونه‌های دیواره راه‌های هوایی: چاهک (M) شاخص اندازه ملکولی 100bp (غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر)، چاهک ۱ و ۲ شامل باند 190bp ژن بتا اکتین نمونه‌های کنترل و چاهک‌های ۳ تا ۱۰ شامل نمونه‌های بیماران می‌باشد. نتایج نشان‌داد که تغییر محسوسی در میزان بیان این ژن در بین دو گروه کنترل و بیمار وجود ندارد.

طور متوسط ۲.۸۹ برابر افزایش یافته‌است. این نتایج تأییدکننده آزمایش PCR بود (نمودار ۱).

به منظور تأیید نتایج حاصل از PCR در سطح کمی از تکنیک Real-Time PCR استفاده شد. نتایج نشان‌داد بیان ژن C-fos در سطح mRNA در مصدومین شیمیایی به



نمودار ۱. نتایج حاصل از مقایسه بیان ژن c-fos در بین دو گروه شیمیایی و کنترل. در این مطالعه از آزمون T-test استفاده شد. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که C-fos در سطح mRNA در مصدومین شیمیایی به طور متوسط ۲.۸۹ برابر افزایش یافته‌است.

## بحث

قرارگرفت. پرایمر طراحی شده برای c-fos توانایی سنتز قطعه‌ای به طول ۲۱۰ جفت باز از ژن مورد نظر را داشت. نتایج به دست‌آمده از تصاویر الکتروفورز بیانگر افزایش این داده‌ها بیان می‌کند فاکتور رونویسی AP-1 ممکن است به عنوان یک عنصر پاسخ‌دهنده به آنتی‌اکسیدان‌ها عمل کند. PDTC به‌طور مستقل یا همراه با TNF- $\alpha$  منجر به افزایش سطح mRNA منومرهای c-fos می‌شود و در نهایت فعالیت اتصالی AP-1 به وسیله PDTC افزایش می‌یابد. با توجه به نتایج به دست‌آمده از نورترن‌بلات، فاکتور رونویسی AP-1 ممکن است به عنوان یک فاکتور رونویسی پاسخ‌دهنده به آنتی‌اکسیدان‌ها عمل کند (۲۲). این مطالب نشان می‌دهد بیان منومرهای c-fos تحت تأثیر برخی آنتی‌اکسیدان‌ها افزایش می‌یابد. در مطالعه‌ای که توسط نورانی، ابراهیمی و همکاران در دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله انجام شد، بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدان در دیواره راه‌های هوایی مصدومین شیمیایی به‌طور چشمگیری در مقایسه با نمونه‌های کنترل افزایش یافت. اما مطالعات ایمونوهیستوشیمی که به دنبال این آزمایشات صورت گرفت، نشان داد حضور پروتئین‌های آنتی‌اکسیدان در دیواره راه‌های هوایی مصدومین شیمیایی نسبت به نمونه‌های کنترل به‌طور قابل‌توجهی کاهش یافته است (۲۳ و ۲۴). بدین ترتیب حضور پروتئین‌های آنتی‌اکسیدان در مصدومین شیمیایی کمتر از حد معمول است و می‌تواند دلیل محکمی برای عدم فعالیت c-fos از طریق تحریک آنتی‌اکسیدان‌ها باشد. محتمل‌ترین توجیه برای افزایش بیان c-fos فعال شدن آن از طریق مولکول TNF- $\alpha$  و مسیر MAPK است و عدم معنی‌دار بودن این افزایش بیان ممکن است در نتیجه کاهش حضور آنتی‌اکسیدان‌ها و عدم القای بیان c-fos توسط این مولکول‌ها باشد. به‌طور کلی و با توجه به نتایج به دست‌آمده از این بررسی، افزایش بیان ژن C-fos، ممکن است نشانگر فعال شدن این مولکول از طریق ROS باشد و ممکن است بیان ژن‌های سیتوکین و ژن‌های التهابی را به دنبال داشته باشد.

در این مطالعه، بیان ژن c-fos که یکی از منومرهای فاکتور رونویسی AP-1 است، توسط PCR مورد بررسی بیان این ژن در دیواره راه‌های هوایی مصدومین شیمیایی بود. به‌منظور تأیید این نتایج بیان این ژن با تکنیک Real-time PCR در دو گروه مصدوم و کنترل بررسی شد و همان‌طور که ذکر شد، افزایش بیان ۲/۸۹ برابری را نشان داد.

یکی از محتمل‌ترین توجیه‌ها برای این مطلب نحوه فعال شدن AP-1 است. به‌طور معمول TNF- $\alpha$  فعالیت AP-1 را از طریق مسیر MAPK القا می‌کند و ناحیه پروموتور بسیاری از سیتوکین‌های التهابی و کموکین‌ها حاوی جایگاه اتصال به AP-1 است. در مطالعه‌ای که توسط Mukhopadhyay S و همکاران بر روی سلول‌های آلوئولی به دنبال تماس با ۲-کلرواتیل‌سولفید (CEES) انجام شد، نشان داد که TNF- $\alpha$  فعالیت AP-1 را در این سلول‌ها القا می‌کند. تماس با ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دوز CEES، ۱ ساعت بعد از تماس به‌طور چشمگیری فعالیت AP-1 را در ریه خوکچه هندی افزایش داد. این نتایج نشان می‌دهد CEES القای مسیرهای پیام‌رسان MAPK را آغاز می‌کند و در نهایت آسیب ریوی را سبب می‌شود. این مسیرهای پیام‌رسان مسئول فسفریلاسیون و فعالیت پروتئین‌های AP-1 هستند (۵). در مطالعه‌ای که توسط عماد و همکاران انجام شد، بیان ژن TNF- $\alpha$  در نمونه‌های سرم مصدومین شیمیایی افزایش یافته بود (۲۱).

اما این مولکول از طریق مسیر دیگری نیز القا می‌شود که می‌تواند نقش بسیار مؤثری در بیان آن داشته باشد. به نظر می‌رسد فاکتورهای رونویسی نظیر AP-1 تحت تأثیر حالت ردوکس سلول تنظیم می‌شوند. فعالیت اتصالی AP-1 به وسیله تغییرات ردوکس باقیمانده‌های سیستئین در دومین‌های اتصالی c-fos به DNA تنظیم می‌شود. به عنوان مثال در سلول‌های هلا فعالیت اتصالی AP-1 به وسیله آنزیم آنتی‌اکسیدان تیوردوکسین، آنتی‌اکسیدان پیرولیدین‌دی‌تیوکربومات (PDTC) و N-استیل‌سیستئین (NAC) افزایش می‌یابد.

## منابع

1. Martin L D, Krunkosky T K, Judith A. Voynow and Adler K B, the Role of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Airway Epithelial Gene Expression. *Environmental Health Perspectives*, 1998. Vol 106: P. 1197-1203.
2. Azad N, Rojanasakul Y, Vallyathan V, Inflammation and lung cancer: Roles of reactive oxygen/nitrogen species. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 2008. 11: p. 1-15.
3. Elsasser A, Franzen M, Kohlmann A, Weisser M, Schnittger S, Schoch C, Reddy V A, Burel S, Zhang D, Ueffing M, Tenen D G, Hiddemann W and Behre G, The fusion protein AML1-ETO in acute myeloid leukemia with translocation t(8;21) induces c-jun protein expression via the proximal AP-1 site of the c-jun promoter in an indirect, JNK-dependent manner. *Oncogene*, 2003. 22: p. 5646-5657.
4. Chinenov Y and Kerppola T K, Close encounters of many kinds, Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene*, 2001. 20: p. 2438-2452.
5. Mukhopadhyay S, Mukherjee S, Smith M, Das S K, Activation of MAPK/AP-1 signaling pathway in lung injury induced by 2-chloroethyl ethyl sulfide, a mustard gas analog. *Toxicology Letters*, 2008. 181: p. 112-117.
6. Chavanas S, Adoue V, Méchin M, Ying S, Dong S, Duplan H, Charveron M, Takahara H, Serre G and Michel Simon, Long-Range Enhancer Associated with Chromatin Looping Allows AP-1 Regulation of the Peptidylarginine Deiminase 3 Gene in Differentiated Keratinocyte. *PLoS ONE*, 2008; 3(10).
7. Hess J, Angel P and Schorpp-Kistner M, AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *Journal of Cell Science*, 2004. 117: p. 5965-5973.
8. Abate C, Curran T, Encounters with Fos and Jun on the road to AP-1, *Semin Cancer Biol.* 1990 Feb; 1(1):19-26.
9. Jurado J, Fuentes-Almagro C A, Prieto-Álamo M J and Pueyo C, Alternative splicing of c-fos pre-mRNA: contribution of the rates of synthesis and degradation to the copy number of each transcript isoform and detection of a truncated c-Fos immunoreactive species. *BMC Molecular Biology*, 2007. 8:83.
10. McClintock S D, Laszlo M. Hoese, Salil K. Das, Gerd O. Till, Thomas Neff, Robin G. Kunke, Milton G. Smith and Peter A. Ward, Attenuation of half sulfur mustard gas-induced acute lung injury in rats, *J. Appl. Toxicol.* 2006; 26: 126-131.
11. Balali-Mood M and Mehrdad Hefazi, Comparison of Early and Late Toxic Effects of Sulfur Mustard in Iranian Veterans, *Clinical Pharmacology & Toxicology* 2006, 99, 273-282.
12. Ishida H, Ray R, Ray P, Sulfur mustard downregulates iNOS expression to inhibit wound healing in a human keratinocyte Model, *Journal of Dermatological Science* (2008) 49, 207-216.
13. Beheshti J, Marka E J, Akbaei H M H, Aslani J, Ghanei M, Mustard lung secrets: Long term clinicopathological study following mustard gas exposure. *Pathology. Research and Practice*, 2006. 202: p. 739-744.
14. Paramov V, Suntres Z, Smith M, Stone W L, Sulfur Mustard Toxicity Following Dermal Exposure, Role of Oxidative Stress, and Antioxidant Therapy. *Journal of burns and wounds*, 2007. 7: p. 60- 85.
15. Ghanei Mostafa, Majid Shohrati, Mehrdad Jafari, Soleyman Ghaderi, Farshid Alaeddini and Jafar Aslani, N-Acetylcysteine Improves the Clinical Conditions of Mustard Gas-Exposed Patients with Normal Pulmonary Function Test. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 103, 428-432. 2008.
16. Momeni A, Enshaeih S, and Meghdadi M, Skin manifestations of mustard gas. *Arch Dermatol*, 1992. 128: p. 775-780.
17. Mandl, H and Freilinger G, First report on victims of chemical warfare in the Gulf War treated in Vienna. *Arch Belges (Supplement)*, 1984: p. 330-340.
18. Eisenmenger W, Drasch G and Clarmann V, Clinical and morphological findings on mustard gas (bis (2-chloroethyl) sulfide) poisoning. *J Forensic Sci*, 1991. 36(6): p. 1688-1698.
19. Jafari M, Dose and time-dependent effects of sulfur mustard on antioxidant system in liver and brain of rat. *Toxicology*, 2007. 231: p. 30-39.
20. Min Qui, Victor M Paromov, Hongsong Yang, Milton Smith and William L Stone, Inhibition of inducible Nitric Oxide Synthase by a mustard gas analog in murine macrophages, *BMC Cell Biology* 2006, 7:39.
21. Emad A, Emad Y, Levels of cytokine in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid in patients with pulmonary fibrosis due to sulfur mustard gas inhalation. *J Interferon Cytokine Res*, 2007. 27(1): p. 38-43.
22. Munoz C, Pascual-Salcedo D, Castellanos MC, Alfranca A, Aragones J, Vara A, Redondo MJ and de Landazuri MO, modulation of NF-kappa B and AP-1 transcription factors activity by human endothelial cells in response to inflammatory mediators: interleukin-8, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits the production of interleukin-6. *Blood*, 1996. 88: p. 3482-3490.
23. Ebrahimi M, Roudkenar MH, Imani Fooladi AA, Halabian R, Ghanei M, Kondo H, Nourani MR. Discrepancy between mRNA and protein expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in bronchial epithelium induced by sulfur mustard. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:823131. Epub 2010 May 20.

24. Nourani Mohammad Reza, Samaneh Yazdani, Mehryar Habibi Roudkenar, Majid Ebrahimi, Raheleh Halabian, Leila Mirbagheri, Mostafa Ghaneil and Abbas Ali Imani Fooladi. HO1 mRNA and Protein do not Change in Parallel in Bronchial Biopsies of Patients After Long Term Exposure to Sulfur Mustard. *Gene Regulation and Systems Biology* 2010;4 83–90

25. Han Suhua, Luis A. Espinoza, Hongling Liao, A. Hamid Boulares & Mark E. Smulson, Protection by antioxidants against toxicity and apoptosis induced by the sulphur mustard analog 2-chloroethylethyl sulphide (CEES) in Jurkat T cells and normal human lymphocytes, *British Journal of Pharmacology* (2004) 141, 795–802.

Archive of SID