

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^۱، محمدحسن کریمفر^۲، عباسعلی ایمانی فولادی^۳، محمدرضا نورانی^{*۴}

کارشناس ارشد بیوشیمی، مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)،^۱ دکتری علوم تشریح، دانشیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، دانشگاه علوم پزشکی ایلام،^۲ دکتری میکروبیولوژی، استادیار، مرکز تحقیقات فرآورده‌های میکروبی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)،^۳ دکتری بیولوژی سلوی، 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 ۱ (AP-1) سبب رونویسی ژن‌های سیتوکین و ژن‌های التهابی می‌شوند. سولفور موستارد نیز به عنوان یک عامل مخاطره‌زای بیرونی به‌طور مشابه سبب افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود. با توجه به گستردگی سیتوکین‌ها و پروتئین‌های التهابی، بر آن شدیدم 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-1^۱ 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 یافته است و این افزایش بیان ممکن است به دنبال افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن پس از مواجهه با سولفور موستارد باشد اما این افزایش 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 ۱ (AP-1)، C-fos.

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۸/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱/۲۲

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

فعالیت AP-1 به سیله تنوعی از تحریکات فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی شامل سیتوکین‌ها، فاکتورهای رشد، پیام استرس نظری رادیکال‌های آزاد اسکیژن (۲۵ و ۹۶)، سم، تحریکات میتوژن (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 به سیله 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 S_2Cl_2 بیس کلرو اتیل سولفید ($\text{C}_2\text{H}_5\text{Cl}$) می‌باشد که طی جنگ تحمیلی بارها توسط رژیم عشی عراق استفاده شده است.^{۱۴} و در پی آن تعداد زیادی از رزمندگان و افراد ساکن در برخی شهرهای مرزی ایران از جمله سردوشت 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.^{۱۵-۱۸} به دنبال تماس با این گاز سطح ROS در این بیماران نیز افزایش می‌یابد.^{۱۹-۲۰} اما مکانیسم آسیب مولکولی این ترکیب پس از افزایش ROS هنوز کاملاً مشخص نیست. با توجه به گستردگی سیتوکین‌ها، برآن شدیدم 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 جمع آوری 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 گرفته‌شد. شرکت‌کنندگان در این طرح به دو گروه تقسیم شدند:

مقدمه

اپیتالیوم راه هوایی اولین سد فیزیولوژیکی بدن در برابر عوامل مخاطره‌زای بیرونی نظیر آلرژن‌ها، ذرات صنعتی، آلاینده‌های محیطی و عوامل غفونت‌زاست. برهم کش‌های فیزیولوژیکی دفاعی که در راه‌های هوایی در پاسخ به ذرات تفسی 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 نشده‌است، 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 کنترل کننده بیان پروتئین‌های ایجاد کننده 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 فعال کننده نوع AP-1 (AP-1 می‌باشد^(۲)). فعال شدن AP-1 منجر به القای ژن‌های سیتوکین و واسطه‌های ایجاد کننده التهاب می‌شود و بر این اساس مولکول AP-1 یک فاکتور حساس به رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشد^(۲).

P-1 تنظیم کننده مهم در رشد سلولی، تمایز، تغییر شکل،
تکثیر (۳)، انکوژن (۴) و آپوپتوز (۵) می باشد. AP-1
Mukhopadhyay, S, et al. 2008 است. اعضای تشکیل دهنده پروتئین AP-1
شامل پروتئین های خانواده Fos یعنی C-fos، C-Jun
و C-Jun، پروتئین های خانواده Jun نظیر Jun-B
و Jun-D (۶) اعضای خانواده فاکتور رونویسی
فعال کننده یعنی ATF-a، ATF-2 و ATF-3 (۷) و
Zif268 خانواده JDP شامل JDP-1 و JDP-2 می باشند. وجه
مشترک تمام این پروتئین ها دومین زیپلوسین حفظ
شده است. درواقع زیپلوسین مسئول دایر شدن این
پروتئین هاست که شرط لازم برای اتصال به DNA
می باشد (۸). همچنین مسئول پایداری و اختصاصی
بودن همو دایمر و هترو دایمر های ایجاد شده به وسیله
پروتئین های Fos و Jun است. پروتئین کد شده توسط این

به منظور ساخت cDNA به وسیله آنزیم ترنس کریپتاز معکوس موجود در کیت CycleScript RT PreMix (Bioneer, Korea) (dN6), مورد استفاده قرار گرفت و cDNA به دست آمده از نسخه برداری معکوس به عنوان الگو برای PCR مورد استفاده قرار گرفت. به منظور انجام PCR، پرایمرهای ژن C-fos و بتاکتین (به عنوان یک ژن خانه دار و برای نرمال سازی بیان ژن ها) طراحی شدند و برای بررسی اختصاصی بودن هر یک از پرایمرها، همولوژی کامل پرایمر مورد نظر با ژن مذکور توسط نرم افزار BLAST تأیید گردید. جدول شماره ۱ توالی پرایمرهای مذکور به همراه دمای اتصال و تعداد نوکلئوتیدها را نشان می دهد. شرایط دمایی PCR شامل مراحل زیر بود: ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۳ سیکل با دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت ۷۲ درجه سانتی گراد 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 یافته های اسپیرومتری و HRTC و بالینی، بیماران را انتخاب و به مطالعه وارد می شدند. تعداد این بیماران ۲۰ نفر بود.

۲- افراد کنترل که به دلایل بالینی و به تشخیص پزشک معالج تحت عمل بروونکوسکوپی قرار می گرفتند ولی پس از بروونکوسکوپی هیچ گونه عارضه شناخته شده ریوی را نشان نمی دادند. همچنین عکس های ریوی (اسکن ریه) این افراد نیز بیانگر عارضه ای مشخص در ریه آن ها نبود.

۱۰ نمونه به عنوان کنترل نیز از این گروه جمع آوری شد. به منظور بررسی اثرات سولفور موستارد در نمونه های بیوپسی ریه، کسانی که سابقه بیماری های ریوی پیش از مواجهه با این گاز را داشتند، افراد مسن، معتادین، افراد سیگاری و بیماران مبتلا به سل از این مطالعه حذف شدند. نمونه های بیوپسی به وسیله پنس بیوپسی و توسط پزشک فوق تخصص ریه از محل ضایعه برداشت شد. پیش

جدول ۱: پرایمر های طراحی شده برای بررسی بیان ژن های مورد مطالعه

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

پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید توسط دستگاه UV قابل شناسایی شدند. به منظور بررسی میزان افزایش بیان در نمونه ها از تکنیک Real-time PCR و آنزیم Master Mix SYBER GREENAB، Takara, Japan استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده های PCR از SPSS13 نمونه های 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 معنی دار در نظر گرفته شد.

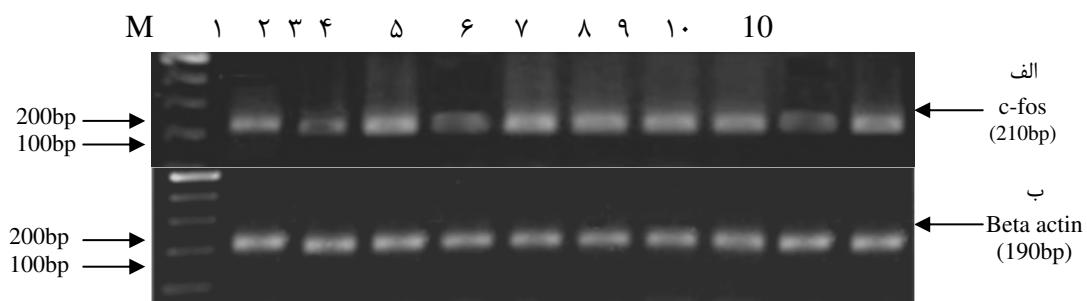
از عمل بروونکوسکوپی، راههای هوایی فوکانی بالاستفاده از لیدوکائین ۲ درصد بی حس شد و پس از نمونه گیری، نمونه های مورد نظر در محلول تخلیص RNA Isolation Reagent (Roche applied science, Germany) قرار گرفته و بلافتله به فریزر -۸۰ درجه سانتی گراد منتقل شدند.

تخلیص RNA و نسخه برداری معکوس واکنش زنجیره ای پلیمراز پس از هموژن کردن بافت بیوپسی توسط هموژنایزر (Heidolph,SilentCrusher, German) تام سلولی با استفاده از محلول تخلیص RNA و طبق پروتکل استخراج شد. میزان RNA استخراج شده با استفاده از اسپکترو فوتومتر نانودرایپ (NanoDrop, ND1000) سنجیده شد. مقدار ۳۰۰ نانوگرم از RNA تام سلولی

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 نشان نداد (شکل ۱ب).

یافته‌ها

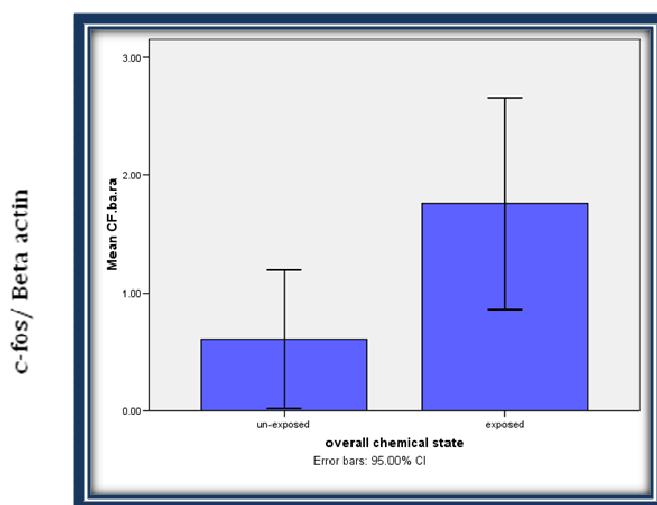
در این مطالعه ۲۰ مصدوم شیمیایی مبتلا به بیماری COPD و ۱۰ نمونه کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. بیان ژن c-fos ابتدا توسط روش PCR در این نمونه‌ها ارزیابی شد. نتایج حاصل از PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد نشان داد بیان این ژن در مصدومین شیمیایی نسبت به



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 (غلهٔ ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر) را نشده است. 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 یافته است. ب) الکتروفوروز نتایج PCR ژن بتا اکتین از نمونه‌های دیواره راه‌های هوایی: چاهک (M) شاخص اندازه ملکولی ۱۰۰bp (غلهٔ ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر)، چاهک ۱ و ۲ شامل باند ۱۹۰bp ژن بتا اکتین نمونه‌های کنترل و چاهک‌های ۳ تا ۱۰ شامل نمونه‌های بیماران می‌باشد. نتایج نشان داد که تغییر محسوسی در میزان بیان این ژن در بین دو گروه کنترل و بیمار وجود ندارد.

طور متوسط ۲.۸۹ برابر افزایش یافته است. این نتایج تأیید کننده آزمایش PCR بود (نمودار ۱).

به منظور تأیید نتایج حاصل از PCR در سطح کمی از تکنیک Real-Time PCR استفاده شد. نتایج نشان داد 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 در سطح mRNA در مصدومین شیمیایی به طور متوسط ۲.۸۹ برابر افزایش یافته است.

قرار گرفت. پرایمر طراحی شده برای c-fos توانایی سنتز قطعه‌ای به طول ۲۱۰ جفت باز از ژن مورد نظر را داشت. نتایج به دست آمده 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 به طور مستقل یا همراه با TNF- α 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 دست آمده از نورترن‌بلاط، فاکتور رونویسی AP-1 ممکن است به عنوان یک فاکتور رونویسی پاسخ‌دهنده به آنتی‌اکسیدان‌ها عمل کند(۲۲). این مطالعه 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 به طور 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 به طور قابل توجهی 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 فعال‌شدن آن از طریق مولکول TNF- α 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.

به طور کلی و با توجه به نتایج به دست آمده از این بررسی، افزایش بیان ژن C-fos، ممکن است نشانگر فعال‌شدن این سیتوکین و ژن‌های التهابی را به دنبال داشته باشد.

بحث

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. به منظور 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 برابر را نشان داد.

یکی از محتمل‌ترین توجیه‌ها برای این مطلب نحوه فعل شدن AP-1 است. به طور معمول TNF- α فعالیت AP-1 را از طریق مسیر MAPK القا می‌کند و ناحیه پرموتور 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- α فعالیت AP-1 را در این سلول‌ها القا می‌کند. تماس با ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دوز CEES، ۱ ساعت بعد از تماس به طور چشمگیری فعالیت AP-1 را در ریه خوکچه هندی افزایش داد. این نتایج نشان می‌دهد CEES القای مسیرهای پیام‌ران MAPK را آغاز می‌کند و در نهایت آسیب ریوی را سبب می‌شود. این مسیرهای پیام‌ران مسئول فسفوپلاسیون و فعالیت پروتئین‌های AP-1 هستند(۵). در مطالعه‌ای که توسط عمد و همکاران انجام شد، بیان ژن TNF- α 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-استیل سیستئین (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, Smithb 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. *Jornal of burns and wounds*, 2007. 7: p. 60- 85.
15. Ghanei Mostafa, Majid Shohrati, Mehrdad Jafari, Soleiman 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 Ghanei1 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-chloroethylsulphide (CEES) in Jurkat T cells and normal human lymphocytes, *British Journal of Pharmacology* (2004) 141, 795–802.