طب‌نظامی
پاییز ۱۳۸۶، شماره ۹ (۳)
صفحات: ۲۱۶-۲۰۷

الگوی سایتوکاینی در ماکروفاژهای رت‌های دریافت کننده سولفور موستارد (گاز خردل)

کاظم احمدی[۱] Ph.D*، علیرضا شهریاری[۲] M.Sc**

آدرس مکاتبه: دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، تهران – ایران

چکیـــده

مقدمه، سایتو کاینها نقش مهمی در فرایند التهاب مزمن و حاد ازجمله التهاب ناشی از گاز خردل دارند.

روش: در این مطالعه پاسخ ماکروفاژهای بدست آمده از رتهای دریافت کننده سولفور موستارد از لحاظ سایتو کاینهای: اینترلوکین –۱ بتا (IL-1β)، اینترلوکین–۶ (IL-6)، اینترلوکین–۱۲ (IL-12)، فاکتور نکروز کننده تومور (TNF-α) و فاکتور تغییر دهنده رشد (TGF-β) بررسی شد. ۱۲ سر رت ار طریق استنشاقی درمعرض یک دوز سولفور موستارد قرار گرفت و با گروه کنترل مقایسه شدند. در فواصل ۲و ۴ و ۶ ماه پس از آلودگی با گاز خردل رتها از طریق بیهوشی کشته و ماکروفازهای صفاقی و ریوی آنها بدست آمد. ماکروفاژهای بدست آمده پس از سه بار شستن، شمارش و به تعداد یک میلیون سلول در چاهک در میکروپلیتهای ۲۴ خانه بمدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵٪ CO2 کشت داده شدند. پس از مدت مذکور مایع رویی را برداشته و بروش الایزا سایتوکاینها اندازه گیری شدند.

نتایج: نتایج پس از ۲ ماه بجزIL-6 (P<0/01) در مقایسه با گروه کنترل معنی دار نبود. پس از ۴ ماه اختلاف معنی داری در سایتو کاینهای TGF-β, IL-6, IL-12, IL-1β در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد(P<0/001). بیشترین افزایش در مقدار IL-6 مشاهده شد(۵۴/۶٪ برای ماکروفاژهای صفاقی و ۶۴/۲۹٪ برای ماکروفاژهای ریوی (P<0/001). نتایج حاصل پس از ۶ ماه اختلاف معنی داری را درترشح تمام سایتو کاین های صفاقی و ریوی (P<0/001) نشان داد (P<0/05برای TNF-α). بیشترین افزایش در موردIL-6 بدست آمد که برای نوع صفاقی این افزایش برابر با ۸۴/۳٪ و برای نوع ریوی ۶۹/۸۳٪ بود (P<0/001). بحث، درمجموع مقادیر سایتو کاینی در گروه دریافت کننده سولفور موستارد متفاوت از گروه کنترل می باشد.

نتیجه گیری: بنابر این می توان نتیجه گرفت که بخشی از اثرات طولانی مدت گاز خردل می تواند ناشی از تغییر در مقدار ترشح سایتو کاین ها باشد.

گل واژگان: سولفور موستارد، ماکروفاژ ، TNF-α ,TGF-β IL-8 ,IL-6 ,IL-1β.

۱- دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) –مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی نویسنده مسئول ۲- دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) –مرکز تحقیقات آسیبهای شیمیایی

مقدمه

سولفور موستارد یک عامل آلکیله کننده الکتروفیلیک با خواص موتاژنیک کارسینوژنیک سایتوتوکسیک و تاول زاست. اثرات سایتو توکسیکی عوامل آلکیله کننده بر روی DNA, RNA و پروتئین ها می تواند منجر به آسیب های موتاژنیک و نهایتا مرگ سلولی شود (۳-۱). با این وجود اثر سولفور موستارد بر پاسخ های ایمنی کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است.اخیرا مطا لعات پراکنده ای بر روی پارامترهای ایمونولوژیک شامل نقش سایتو کاینها در آسیب های ریوی، و ایجاد نقص ایمنی مزمن انجام گرفته است (۴).

تحقیقات همچنین نشان داده که سایتوکاینهای پیش التهابی نظیر IL-1β, IL-6, TNF-α باعث افزایش پاسخ های بافتی موضعی از قبیل افزایش درجه حرارت، گشادی عروق ، بازگشت سلولهای پیش التهابی و نابودی میکروارگانیسمها می شوند (۴). Papirmeiter و همکارانش (۵) نشان دادند که اثرات سایتو توکسی سیتی سولفور موستارد وابسته به الکیلاسیون در سلول هدف بوده بنابر این در کنترل فرایند سلولهای عادی اختلال ایجاد می کند. در این فرایند مجاری تنفسی بیشتر از همه تحت تاثیر قرار می گیرند (۸-۶). مطالعات کمی در مدل های حیوانی (۹و۱۰) و آزمایشگاهی در سلولهای اپی تلیال تنفسی بعنوان هدف اصلی سولفور موستارد انجام گرفته است (۱۱و۱۲). تحقیقات در مورد اثرسولفور موستارد روی سلولهای اپی تلیال تراشه نشان داده که دوز کم سولفور موستارد باعث آپوپتوزیس شده در حالیکه دوزهای بالاتر منحر به نکروز سلولی می شود (۱۴و۱۳). در کارگران ژاپنی کارخانجات تولید کننده گازهای شیمیایی افزایش مرگ در اثر بیماری های ریوی و همچنین افزایش برونشیت مزمن گزارش شده است (۱۵). Manning و همکارانش نشان داده اند که پنومونی تنها علت مرگ در کارگران در کارخانجات تولید سولفور موستارد در انگلیس بوده است (۱۶). عده ای از محققین نیز نتایج مشابهی در مورد اثرات گاز خردل در ریه نشان داده اند (۱۷و۱۸). تحقیقات همچنین نشان داده که مرگ سلولی ناشی از سولفور موستارد بدلیل آپوپتوزیس سریع و نکروز تاخیری می باشد (۱۴). هر چند مطالعات کمی درمورد اثرات گاز خردل بر سیستم ایمنی صورت گرفته است با این وجود مطالعات آزمایشگاهی روی سلولهای منو نوکلئر نشان داده که مرگ سلولی وابسته به زمان می باشد (۱۹). Cowan ثابت کرده که سولفور موستارد باعث افزایش ترشح اینترلوکین-۸ توسط سلولهای کراتینوسایت اپی درمال انسانی در محیط کشت می شود. او همچنین نشان داده که این افزایش می تواند یک نشانگری (مارکر) بر اثر پیش التهابی سولفور موستارد باشد (۱۷). در معرض قرار دادن کراتینو سایت های اپی درمال انسانی به۱۰۰ میکرومولار گاز خردل در محیط کشت بمدت ۲۴ ساعت باعث افزایش IL-8 شده است، در صورتیکه در غلظتهای بالاتر باعث کاهش آن شده است (۲۱). سولفور موستارد همچنین باعث تحریک فاگوسیتوزیس شده (۲۲) و در طولانی مدت باعث افزایش درصد مونوسیتها و لنفوسیتهای TCD_3^+ و کاهش درصد سلولهای CD_{16}^+ در بیماران شده است (۲۳). در مطالعه ای دیگر Lardot نشان داده است که مقدار یک مولار سولفور موستارد باعث افزایش ترشح IL-8 توسط کراتینوسایتهای انسانی در محیط کشت شده درحالیکه غلظتهای ۱ و ۱۰ میکرو مولار تغییر معنی داری در مقایسه با گروه کنترل ایجاد نکرده است (۲۴).

از طرف دیگر سیستم مونوسیت ماکروفاژ با ترشح بیش از ۱۵۰ ماده ترشحی نقش مهم و مرکزی در شروع پاسخ های التهابی داشته و در بعضی از حالات باعث آسیب های بافتی در بیماری های خود ایمنی می شود. بنابر این اثر سولفور موستارد بطور مستقیم یا غیر مستقیم بر روی ماکروفاژها می تواند باعث تغییراتی در پاسخ های ایمنی شود و همین موضوع انگیزه ای بر مطالعه اثر گاز خردل بر سایتو کاینهای مترشحه توسط ماکروفاژهای صفاقی و ریوی در این تحقیق بود.

مواد و روش‌ها

۲۴ سر رت نر با ۸ هفته سن و ۱۵۰ گرم وزن در دو گروه ۱۲ تایی کنترل و تست انتخاب شدند. بعد از بدست آوردن نظر کمیته دانشگاهی برای حفاظت حیوانات آزمایشگاهی، رت ها در قفس

های بدون گرد و غبار و با بستر مناسب نگه داری شدند. ۱۲ سر رت در گروه تست در جعبه های کوچک بمدت ۳۰ دقیقه بصورت استنشاقی در معرض $۴۲/۳mg/m^3$ گاز خردل در استون قرار گرفتند (۲۵). ۱۲ سر رت گروه کنترل بمدت ۳۰ دقیقه فقط در معرض استون قرار گرفتند. بدلیل ادامه مرگ حیوان بعد از ۶ ماه مطالعه پس از ۶ ماه متوقف شد (۲۶). رت ها ۲، ۴، و ۶ ماه پس از آلودگی با گاز خردل با استفاده از اتر کشته و ماکروفاژهای آنها بروش معمول تهیه شد.

روش تهیه ماکروفاژ

ماکروفاژهای صفاقی: مقدار ۵۰ میلی لیتر محلول PBS سرد را بداخل صفاق رت تزریق کرده و پس از ماساژ سطح پریتوان به منظور آزاد سازی هرچه بیشتر ماکروفاژهای صفاقی به کمک پیپت پلاستیکی مایع داخل صفاق جمع آوری و به لوله های سانتریفیوژ در شرایط یخ (۴ درجه سانتی گراد) انتقال یافت. سلول ها ۳ بار با PBS سرد با دور ۱۵۰۰g سانتریفیوژ شدند. در مرحله آخر مایع رویی را دور ریخته و رسوب سلولی ته لوله را در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ حاوی ۱۰ ٪ FCS و مقدار مناسب آنتی بیوتیک معلق نمودیم. پس از آن سوسپانسیون سلولی تهیه و درصد سلول زنده بروش محلول رنگی ترپان بلو شمارش شد.

ماکروفاژهای ریوی: مقدار ۱۰ میلی لیتر PBS سرد را بآرامی از طریق تراشه بداخل ریه تزریق کرده و با ۶ بار تکرار و مکش مایع تزریقی مایع لاواژ تهیه و به لوله سانتریفوژ انتقال یافت. مایع لاواژ را سه بار با PBS سرد و سانتریفوژ در دور ۱۵۰۰g بمدت ۵ دقیقه شسته و نهایتا رسوب سلولی را در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ حاوی ۱۰ ٪ FCS و مقدار مناسب آنتی بیوتیک معلق نمودیم. پس از آن سوسپانسیون سلولی تهیه و درصد سلول زنده بروش محلول رنگی ترپان بلو شمارش شد.

کشت سلولی: سلولهای هر حیوان در دوگروه را جداگانه شمارش نموده و به تعداد یک میلیون سلول در یک میلی لیتر محیط کشت کامل به هر چاهک میکرو پلیت های ۲۴ خانه انتقال داده شدند. سلولها بمدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد در حضور ۵٪ CO_2 انکوبه شد ند. پس از ۲ ساعت به منظور حذف سلولهای غیر چسبنده (غیر ماکروفاژ) مایع رویی هر چاهک را بآرامی برداشت و بیرون ریخته و چاهک ها سه بار با PBS گرم شسته شد ند. به سلولهای چسبیده به ته پلیت (ماکروفاژها) یک میلی لیتر محیط کشت کامل حاوی ۱۰ میکروگرم LPS اضافه و بمدت ۲۴ ساعت در شرایط فوق انکوبه شدند. پس از ۲۴ ساعت مایع رویی هر چاهک را جداگانه برداشت و به لوله های اپندورف انتقال داده و مقادیر سایتو کاین هر نمونه بروش الایزا و با استفاده از کیت Bender Med System Company, USA اندازه گیری شد.

روش آماری: با استفاده از نرم افزار Mynova و روش Anova مدل ۱ داده های بدست آمده آنالیز شدند.

نتایج

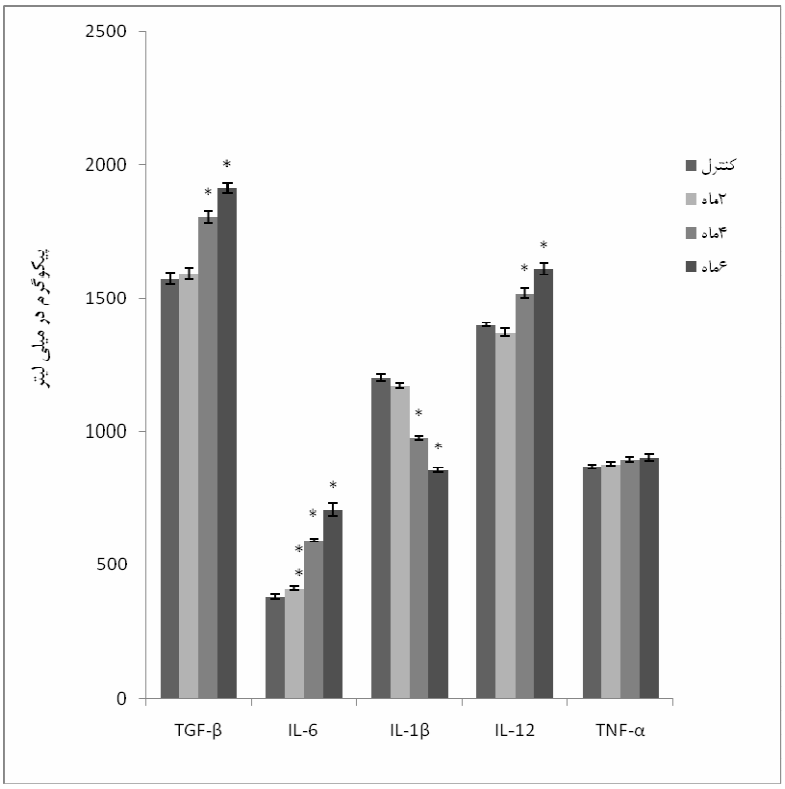
نتایج نشان داد که اسنشاق گاز خردل در بر هم زدن نظم بیشتر سایتوکاین های مترشحه توسط ماکروفاژهای صفاقی و ریوی دخالت دارد. نتایج پس از بررسی ۲ ماهه اختلاف معنی داری را در ترشحIL-6 بین گروه کنترل و گروه تست نشان داد ($P<0/01$ برای ماکروفاژهای صفاقی و $P<0/001$ برای ماکروفاژهای ریوی). در آن گروه از رتها که پس از ۴ ماه مورد آزمایش قرار گرفتند، اختلاف معنی داری بین گروه تست و کنترل از لحاظ ترشح TGF-β, IL-$_6$, IL-$_{12}$,IL-$_1$β توسط هر دو ماکروفاژهای صفاقی و ریوی مشاهده شد ($P<0/001$) (جدول ۱و شکل ۱و۲).

بیشترین تغییرات افزایشی در مورد IL-6 مشاهده شدکه به ترتیب برابر ۵۴/۶۷و ۶۴/۲۹ درصد برای ماکروفاژهای صفاقی و ریوی بود ($P<0/001$). نتایج پس از ۶ ماه اختلاف معنی داری را در تمام سایتو کاین های مترشحه توسط ماکروفاژهای صفاقی و ریوی نشان داد ($P<0/001$). نتایج پس از ۶ ماه نشان داد که بیشترین افزایش در مورد IL-6حاصل شده که این افزایش برای ماکروفاژهای صفاقی ۸۴/۳٪ و برای ماکروفاژهای ریوی ۶۹/۸۳٪ بود (جدول ۱ و شکل ۱و۲).

جدول ۱. درصد تغیرات سایتوکاینهای مترشحه توسط ماکروفاژهای صفاقی و ریوی در مقایسه با گروه کنترل.

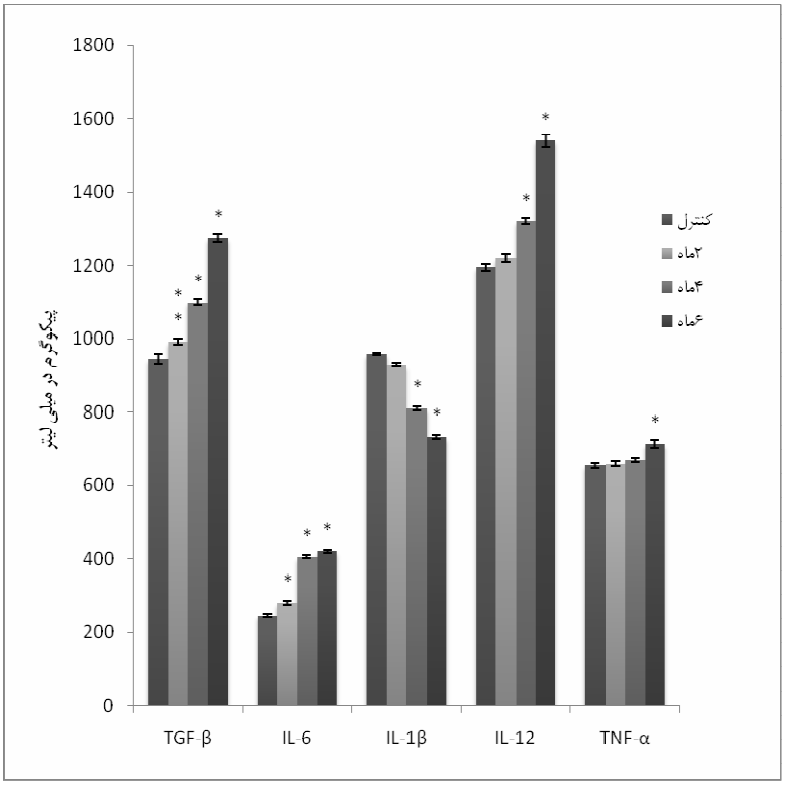
زمان → / سایتوکاین ↓	۲ماه		۴ماه		۶ماه	
	ماکروفاژ صفاقی	ماکروفاژ های ریوی	ماکروفاژ صفاقی	ماکروفاژ ریوی	ماکروفاژ صفاقی	ماکروفاژ ریوی
TGF-β	۱/۲۷ ↑	۴/۸۵ ** ↑	۱۴/۸۳* ↑	۱۶/۲* ↑	۲۱/۶* ↑	۳۴/۵۱* ↑
IL-6	۷/۷ ** ↑	۱۳/۲۲* ↑	۵۴/۶۷ * ↑	۶۴/۲۹* ↑	۸۴/۳ * ↑	۶۹/۸۳*
IL-1β	۲/۴۹ ↓	۲/۹۵ ↓	۱۸/۴۹* ↓	۱۵/۴۷* ↓	۲۸/۹۵* ↓	۲۳/۵۱* ↓
IL-12	۲/۱ ↓	۱/۹۶ ↑	۸/۵۷ * ↑	۱۰/۳۱ * ↑	۱۴/۸۷* ↑	۲۸/۶۹*
TNF-α	۱/۱۲ ↑	۰/۵۱ ↑	۲/۹۸ ↑	۲/۰۴ ↑	۳/۷۵ ↑	۸/۸۶ * ↑

* P<0.001, ** P<0.01



شکل ۱. ترشح سایتو کاین ها توسط ماکروفاژهای صفاقی رت در پاسخ به لیپو پلی ساکارید ۲و٤ویا ٦ ماه پس از تماس با گاز خردل .

*p<0.001 , **p<0.01



شکل ۲. ترشح سایتو کاین ها توسط ماکروفاژهای ریوی رت در پاسخ به لیپو پلی ساکارید ۲و٤ویا ٦ ماه پس از تماس با گاز خردل .

***p<0.001 , **p<0.01**

بحث

نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان داد که گاز خردل باعث بهم خوردن سطح سایتو کاین های مترشحه توسط ماکروفاژهای صفاقی و ریوی می شود. در تایید نتایج بدست آمده در این مطالعه Levitt(27) ثابت نموده که سولفور موستارد در دوزهای ۲۵ تا ۵۰ میکرومولار باعث تحریک اولیه سلولهای بیگانه خوار در تولید و ترشح واسطه های شیمیایی وابسته به اکسیژن می شود ولی در دوزهای ۵۰ تا ۱۰۰میکرومولار باعث آپوپتوزیس در همین سلولها می شود. بنابراین دانستن مکانیزم هایی که طی آن سولفور موستارد باعث فعالیت سلولهای بیگانه خوار یا عمل آپوپتوزیس می شود در درمان التهاب حاصل از تماس گاز خردل بسیار موثر می باشد.

با توجه به گزارش ها مبنی بر اینکه نیتریک اکساید مترشحه توسط ماکروفاژها در آسیب های ناشی از گاز خردل موثر می باشد (۲۸) Sawyer و همکارانش (۲۹-۳۱)نیز ثابت کرده اند که سلولهای تیمار شده با (L-NAME) (آنالوگ آرژینین و مهار کننده آنزیم سنتز کننده نیتریک اکساید)در حالت وابسته به غلظت باعث حفاظت علیه توکسی سیته ناشی از گاز خردل در محیط کشت می شود.

از طرف دیگر L-NAME موثرنرین دارو در ایجاد حفاظت علیه توکسی سیته ناشی از گاز خردل شناخته شده است، لذا ماکروفاژ با تو لید بیش از ۱۵۰ ماده پروتئینی و غیر پروتئینی اصلی ترین سلول در تولید نیتریک اکساید می باشد. در این مطالعه ما مقدار نیتریک اکساید را اندازه گیری نکردیم ولی وقتی ماکروفاژها تحریک می شوند همرا ه با ترشح سایتو کاین های IL-1β, IL-6,

IL-12, TNF-α نیتریک اکساید نیز ترشح می کنند. در تایید نتایج بدست آمده در این مطالعه Levitt ثابت نموده که سولفور موستارد ماکروفاژها را در تولید و ترشح واسطه های شیمیایی تحریک می کند (27). در این مطالعه IL-6 بیشترین افزایش را در پاسخ به سولفور موستارد داشته که با یافته های دیگران که ثابت نموده اند IL-6 یک بیو مارکر در مدل های آلودگی با گاز خردل می باشد مطابقت دارد (۲۸). نتایج بدست آمده در این تحقیق با یافته های Sabourin و همکاران نیز که افزایش IL-1β, IL-6, IL-8 را نشان داده اند مطابقت دارد. آنها در گزارش خود نشان داده اند کهIL-6 می تواند بیومارکر خوبی در ارزیابی داروهای ضد التهابی در درمان ضایعات ناشی از گاز خردل باشد. باتوجه به اثر فید بک منفی IL-6در ترشح نیتریک اکساید (۳۵)، می توان گفت که نیتریک اکساید احتمالا مسئول بخشی از آسیب های ناشی از گاز خردل بوده و IL-6 با تنظیم منفی تولید نیتریک اکساید تلاش میکند که نقش مخرب سولفور موستارد را در ایجاد آسیب های بافتی از طریق نیتریک اکساید کاهش دهد. بعبارتی ماکروفاژها با تولید و ترشح IL-6 سعی میکنند که اثر تحریکی IL-1β بر ماکروفاژها در تولید نیتریک اکساید را کنترل کنند (تنظیم خود بخودی). IL-1β یک محرک قوی در تولید نیتریک اکساید توسط ماکروفاژها بوده و همانطور که در جدول ۱ مشاهده می شود کاهش قابل توجه ای در سطح IL-1β مترشحه توسط ماکروفاژهای صفاقی و ریوی بوجود آمده که احتمالا می تواند دلیلی بر نقش مهم ماکروفاژها در تولید آسیبهای بافتی متعاقب آلودگی با گاز خردل باشد.

از طرف دیگر سلولهای Th_2 , Th_1 نیز با تولید سایتوکاینهایی اعمال ماکروفاژها را کنترل می کنند. در این رابطه Qabar(36) عقیده دارد که افزایش بیش از حد IL-10 تولید و ترشح سایتوکاینهای پیش التهابی نظیرIL-6, IL-8 را پس از آلودگی با گاز خردل مهار می کند. در این مطالعه نتایج نشان میدهد که مقدار ترشح دو سایتوکاین IL-12, TGF-βبعد از ۴ و ۶ ماه افزایش داشته اند که دلیلی بر نوترکیبی ژنی پس از آلودگی با گاز خردل می باشد. از طرفی با توجه به اینکهIL-8 نقش مهمی در جذب سلولهای لکوسیتی در انسان دارد بنابر این به نظر می رسد که افزایش IL-8 متعاقب آلودگی با گاز خردل نشان دهنده حوادث التهابی زود رس باشد. Rikimaru et al. (37)Tanaka et al. (38) نیز ترشح واسطه های شیمیایی در کشت بافتهای پوستی در معرض خردل را نشان داده اند. بعضی از محققین نیز در مطالعه ای بر روی جانبازان شیمیایی اختلاف معنی داری را در سطح TGF-β در مقایسه با گروه کنترل نشان داده اند (۳۹). آنها همچنین گزارش نموده اند که تجویز گاما اینترفرون می تواند در کاهش التهاب بافتی این گروه از جانبازان مفید باشد.

گزارشاتی نیز مبنی بر مهار پاسخ های ایمنی متعاقب آلودگی با گاز خردل وجود دارد (۴۰). در این مطالعه نتایج نشان میدهد که مقدار TGF-β, IL-12 پس از ۴ و ۶ ماه از آلودگی با گاز خردل افزایش قابل ملاحظه ای داشته است. بنابراین با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق و سایر همکاران مبنی بر دخالت TGF-β, IFN-γدر آسیب های بافتی ناشی از گاز خردل در طولانی مدت بنظر میرسد که ارتباط نزدیکی بین سلول هایT و ماکروفاژ وجود داشته باشد. در تایید این نظر Qabar(36) نیز نشان داده که IL-10, TNF-α می توانند اجزاء خوبی در درمان آسیب های ناشی از خردل باشند. در این مطالعه اثر سولفور موستارد بر ترشح TNF-αبعد از ۲ و۴ ماه در مقایسه با گروه کنترل معنی دار نبودولی افزایش کمی بعد از ۶ ماه مشاهد ه شده است (۳/۷۵٪ افزیش در مورد ماکروفاژهای صفاقی و ۸/۸۶٪ در مورد ماکروفاژهای ریوی). نتایج بدست آمده در مورد TNF-α با یافته های Sabourin (34) و همکارانش همخوانی دارد که آنها نیز افزایش کمی را در مورد TNF-α گزارش نمودند. آنها همچنین نقش سایتو کاینهای IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α را در پیدایش آسیب های پوستی ناشی از خردل گزارش نموده اند. Rogers (۴۱)نیز در یک مطالعه آنالیز ژن با روش micro array در کشت پوست موش در معرض سولفور موستارد، افزایشی را در ۱۹ ژن مرتبط با اپوپتوزیس، چرخه سلولی، التهاب، انکوژن و مهار کننده تومور نشان داده است.

نتیجه کلی: با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق و یافته

های سایر همکاران (۴۲) به نظر می رسد که بخشی از مجموع حوادثی که باعث آسیب بافتی و التهاب پس از آلودگی با گاز خردل می شود می تواند ناشی از تغییرات در سطح سایتو کاین های مترشحه توسط ماکروفاژها باشد. با این وجود هنوز نمی توان دقیقا سایتوکاین مشخصی را مسئول این التهاب دانست. پیشنهاد می شود که با ایجاد یک مدل حیوانی و خنثی سازی هر کدام از سایتوکاینها بصورت انفرادی، سیر التهاب ناشی از گاز خردل و نقش مداخله گر سایتوکاینها را پی گیری نمود.

تشکر و تقدیر

با تشکر از مرکز تحقیقات آسیبهای شیمیایی در تامین بودجه لازم برای انجام این پروژه تحقیقاتی و اداره تحقیقات دانشگاه در تصویب پروژه و ایجاد تسهیلات لازم.

منابع:

1. Sanderson, B.J.S. and A.J. Shield, (1996). Mutagenic damage to mammalian cells by therapeutic alkylating agents. Mutation Research , 355, 41-57.

2. Greenberg, S., P. Kamath., J. Petrali, T. Hamilton, J. Garfield and J.A. Garlick, (2005). Characterization of the initial response of engineered human skin to sulphur mustard. Toxicol Sci. PMID 16141436.

3. Naraghi, Z.S., P. Mansouri and M. Mortazavi, (2005), A clinicopathological study on acute cutaneous lesions induced by sulphur mustard gas (Yperite). Eur J dermatol, 15(3),140-45.

4. Rook G. and A. Zumla, (1997). Gulfwar syndrome: is it due to a systemic shift in cytokine balance towards a Th2 profile. Lancet, 349 , 1831-33.

5. Papirmeister, B., A.J. Feiter, S.I. Robinson and R.D. Ford, (1991). Medical Defence against mustard Gas: Toxic Mechanisms and pharmacological implications. 359. CRC Press, Boca Raton, FL.

6. Elsayed, N.M. and T. Omayes, (2004). Biochemical changes in mouse lung after subcutaneous injection of the sulfur mustard 2-chloro ethyl 4-chlorobutyl sulphide. Toxicology, 199 (2-3), 195-206.

7. Emad, A. and G.R. Rezaian, (1999). Immunoglobulins and cellular constituents of the BAL fluid of patients with sulfur mustard gas induced pulmonary fibrosis. Chest, 115, (5), 1346-51.

8. Emad, A. and G.R. Rezaian,(1997). The diversity of the effect of sulfur mustard gas inhalation on respiratory system . 10 years after a single heavy exposure . Analysis of 197 cases. Chest, 112, 734-38.

9. Anderson, D.R., J.J. Yourick, R.B. Moeller, P. Petrali, G.D. Young and S.L. Byers, (1996). Pathologi changes in rat lungs following acute sulfur mustard inhalation. Inhalation Toxicoloy, 8, 285-97.

10. Calvet, J.H., P.H. Jerreau, M. Levame, M.P. d'Orto, H. Lorino, A. Harf and I. Macquin-Mavier, (1994).Acute and chronic respiratory effects of sulfur mustard intoxication in gunea pig. Journal of Applied physiology, 76, 681-88.

11. Chevillard, M., Lainee P, Robineau P and E. Puchelle, (1992). Toxic effects of sulfur mustard on respiratory epithelial cells in culture . Cell and Biological Toxicology, 8,171-81.

12. Lindsay, C.C. and J.L. Hambrock,(1997).

Protection of A 549 cells against the toxic effects of sulfur mustard by hexamethylenetetramine. Human and experimental Toxicology, 16, 106-14.

13. Calvet, J.H., M. Feuermann, B. Llorente, F. Loison, A. Harf and F. Marano, (1999). Comparative toxicity of sulfur mustard and nitrogen mustard on tracheal epithelial cells in primary culture. Toxicology inVitro, 13, 859-66.

14. Kan, R.K., C.M. Pleva, T.A. Hamilton, D.R. Anderson and J.P. Petrali, (2003). Sulfur mustard-induced apoptosis in hairless guinea pig skin. Toxicol Pathol, 31(2), 185-90.

15. Sasser, L.B., J.A. Cushing and J.C. Dacre, (1996). Two Generation reproduction study of sulfur mustard in Rats. Reproductive Toxicology, 10 (4). 311-319.

16. Manning, K.P., D.C.G. Skegg, P.M. Stelland and R. Doll, (1981). Cancer of the larynx and other occupation hazards of mustard gas workers. Clin Otholaryngol . 6, 165-70.

17. Ghanei, M., S. Akhlaghpoor, M.M. Mohammad and J. Aslani, (2004). Tracheobronchial stenosis following sulphur mustard inhalation. Inhal Toxicol. 16(13), 845-49.

18. Ghanei, M., M. Mokhtari, M.M. mohammad and J. Aslani, (2004). Bronchiolitis obliterans following exposure to sulphur mustard: Chest high resolution computed tomography. Eur J Radiol. 52(2),164-69.

19. Meir, H.L., (1996). The time-dependent effect of 2,2'-dichlorodiethyl sulphide (sulfur mustard, HD, 1,1' –thiobis{ 2-chloroethanol} on the lymphocyte viability and the kinetics of protection by poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor s. Cell Biol Toxicol , 12 (3), 147-53.

20. Cowan, F.M., C.A. Broomfield, and W.J. Smith, (2002). Suppression of sulphur mu7stard-increased Il-8 in human keratinocyte cell cultures by serine protease inhibitors: implications for toxicity and medical countermeasures. Cell Biol Toxicol.18(3). 175-80.

21. Arrovo, C.M., C.A. Broomfield, and B.E. Hackley, (2001). The role of Interleukin-6 (IL-6) in human sulphur mustard (HD) toxicology, Int J Toxicol, 20(5),281-96.

22. Vavra, A.K., C.J. Laurent, V. Ngo, J.F. Sweenev and J.M. Levitt, (2004). Sulfur mustard primes phagocytosis and degranulation in human polymorphonuclear leukocyte. Int Immunopharmacol. 4(3). 437-45.

23. Mahmoudi, M., M. Hefazi, M. Rastin and M. Balali-Mood, (2005). Long term haematological and immunological complications of sulphur mustard poisoning in Iranian veterans. Int Immunopharmacol. 5(9). 1479-85.

24. Lardot, C., V. Dubois and D. Lison, (1999). Sulfur mustard upregulates the expression of intereukin -8 in cultured human keratinocytes. Toxicology Letters, 110, 29-33.

25. Kumar, O., K. Sugendran and R. Ijayaraghavan, (2001). Protective effect of various antioxidants on the toxicity of sulfur mustard administred to mice by inhalation or percutaneus

routs. Chemio-Biological Interations , 134, 1-12.

26. Ahmadi, K. and H.M.H. Akbari, (2005). Effect of sulfur mustard on the lung tissue J. of Military Medicine, 7 (3), 221-225.

27. Levitt, J.M., I.J. Lodhi, P.K. Nguyen, V. Ngo, R. Clift, D.B. Hinshaw and J.F. Sweeney, (2003). Low-dose sulphur mustard primes oxidative function and induces apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes. Int Immunopharmacol. 3(5), 747-56.

28. Nyska, A., L. Lomnitski, R. Maronpot, C. Moomaw, B. Brodsky, A. Sintov and U. Wormser, (2001). Effects of Iodin on inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in sulphur mustard-induced skin. Arch Toxicol, 74(12), 768-74.

29. Sawyer, T.W., (1998a). Modulation of sulfur mustard toxcicity by arginine analogues and related nitric oxide synthase inhibitors in vitro. Toxicol Sci, 46(1), 112-23.

30. Sawyer, T.W., (1998b). Characterization of the protective effects of L-nitroarginine methyl ester (L-NAME) against the toxicity of sulfur mustard in vitro. Toxicology, 131(1), 21-32.

31. Sawyer, T.W., (1999), Synergistic protective effects of selected arginine analogus against sulfur mustard toxicity in neuron culture. Toxicol Appl Pharmacol. 155(2),169-76.

32. Ricketts, K.M, C.T. Santa, J.A. France, A.M. Graziosi, T.D. Dovel, M.Y. Gazaway and R.P. Casillas, (2000). Inflammatory cytokine response in sulphur mustard-exposed mouse skin. J Appl Toxicol, 1, S73-76.

33. Arrovo, C.M., R.K. Kan, D.L. Burman, D.W. Kahler, M.R. Nelson, C.M. Corun, J.J. Guzman and C.A. Broomfield, (2003). Regulation of 1-alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 on interleukin-6 and interleukin-8 induced by sulphur mustard (HD) on human skin cells. Pharmacol Toxicol. 92(5), 204-13.

34. Sabourin, C.L., M.M. Danne, K.L. Buxton, R.P. Casillas and J.J. Schlager (2002). Cytokine chemokine and matrix metalloproteinase response after sulphur mustard injury to weanling pig skin. J Biochem Mol Toxicol. 16(6),263-72.

35. Ahmadi, K. and A.B. McCruden, (1999). Five alpha dihydrotestosterine (5a-DHT) may modulate Nitric Oxide release via endogenouse cytokines in peritoneal macrophages of NZB/BALBc Mice, Medical J. of the Islamic Republic of Iran, 13(3), 207-211.

36. Qabar, A., M. Nelson, J. Guzman, C. Corun, B.L. Hwang and M. Steinberg, (2005). Modulation of sulphur mustard induced cell death in human epidermal keratinocytes using IL-10 and TNF-alpha. J Biochem Mol Toxicol, 19(4). 213-25.

37. Rikimaru, T., M. Nakamura and T. Yano, (1991). Mediators initiating the inflammatory response released in organ culture by full-thickness human skin explants exposed to the irritant sulfur mustard. J .Invest. Dermatol, 96, 888-97.

38. Tanaka, F., A.M. Dannenberg and K. Higuchi (1997). Chemotacti factors released in culture by intact developing and healing skin lesions produced in rabbits by the irritant sulfur mustard. Inflammation, 21, 251-67.

39. Aghanouri, R., M. Ghanei, J. ASlani, H. Keivani-Amine, F. Rastegar, and A. Karkhaneh, (2004). Fibrogenic cytokine levels in bronchoalveolar lavage aspirates 15 years after exposure to sulfur mustard. Am J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physio, 287, (6), L1160-64.

40. Hassan, Z.M. and M. Ebtekar, (2001). Modeling for immunosuppression by sulfur mustard. Int. Immunopharmacol. 1(3), 605-10.

41. Rogers, J.V., Y.W. Choi, R.C. Kiser, M.C. Babin, R.P. Casillas, J.J. Schlager and C.L. Sabourin, (2004). Microarray analysis of gene expression in murine skin exposed to sulphur mustard. J. Biochem Mol Toxicol. 18(6). 289-99.

42- Ahmadi K, and Solguie G. (2006). Cytokine pattern in sera and broncho-alveolar lavage six months after single exposure to sulfur mustard. Medical Journal of the Islamic Republic of Iran.20 (2), 52-56.