

بررسی اثر درمانی داروی کلشی سین در آسیب دیررس ریوی ناشی از گاز خردل در مدل حیوانی

تورج روشن ضمیر* M.D، فاطمه قسامی** M.D، سید علی علوی** M.D، نوشین میرخشتی^ک M.D، لیلا انصاری** M.D

چکیده

هدف: در میان عوارض دیررس مصدومین گاز خردل (SM)، مشکلات ریوی من جمله برونشیت مزمن و فیبروز ریوی مهمترین علت ناتوانی بلندمدت در بیماران می باشد. کلشی سین دارای اثرات ضد التهابی بوده و در فیبروز ریوی ناشی از سایر علل کاربرد داشته است. براین اساس و با توجه به نقش استرس اکسیداتیو در پاتوژنز برونشیت مزمن و فیبروز ریوی، در این مطالعه به بررسی اثر درمانی کلشی سین در عوارض دیررس SM و نقش استرس اکسیداتیو در مکانیسم اثر آن در مدل حیوانی پرداختیم.

مواد و روشها: یک ماه پس از مواجهه موشهای سوری نر با SM، یک گروه شش تایی به عنوان گروه مداخله و یک گروه ۶ تایی به عنوان شاهد مثبت انتخاب شد. پس از کشتن و نمونه گیری از موشها، شاخصهای التهاب و فیبروز ریوی و استرس اکسیداتیو در گروه مداخله با گروه شاهد مثبت مقایسه شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل نشان دهنده کاهش درصد فضای آلئولی ریه و ویتامین C و کاتالاز سرمی و افزایش ارتشاح لنفوسیتها و هیدروکسی پرولین بافتی و افزایش مقدار H₂O₂ سرمی در گروه شاهد مثبت در مقایسه با شاهد منفی بود. در گروه مداخله افزایش ویتامین C و کاتالاز سرمی و کاهش هیدروکسی پرولین بافتی و H₂O₂ سرمی نسبت به گروه شاهد مثبت مشاهده گردید. علاوه بر این در سایر موارد تفاوت معناداری بدست نیامد.

نتیجه گیری: کلشی سین به واسطه کاهش التهاب و استرس اکسیداتیو ناشی از گاز خردل می تواند در کاهش عوارض دیررس ریوی گاز خردل موثر باشد.

واژه‌های کلیدی: گاز خردل، استرس اکسیداتیو، کلشی سین، عوارض دیررس ریوی

مقدمه:

واقع شوند.

کلشی سین یک داروی ضد التهابی است که از طریق اتصال به پروتئین داخل سلولی توبولین و در نتیجه جلوگیری از پلیمریزاسیون آن با میکروتوبولها و جلوگیری از مهاجرت لکوسیتها و فاگوسیتها عمل می کند (۹). گذشته از آن کلشی سین جزء پروتکل درمانی فیبروز ریوی ایدیوپاتیک نیز می باشد (۱۰) و در برخی مقالات اثرات پیشگیرانه آن در ایجاد فیبروز ریوی به اثبات رسیده است (۱۱).

بنابراین با توجه به اثر کلشی سین بر کاهش التهاب و درمان فیبروز ریوی و با توجه به اینکه برونشیت مزمن و فیبروز ریوی دو تابلوی بالینی شایع در آسیب دیررس ریوی ناشی از SM هستند و با عنایت به نقش احتمالی استرس اکسیداتیو در ایجاد عوارض دیررس SM، هدف این مقاله بررسی اثر درمانی کلشی سین بر عوارض دیررس ریوی SM و نقش استرس اکسیداتیو در مکانیسم اثر داروی فوق و پاتوژنز آسیب دیررس ناشی از SM می باشد. فاکتورهای مورد بررسی جهت ارزیابی استرس اکسیداتیو شامل: پراکسید هیدروژن، ویتامین C و آنزیم کاتالاز می باشد.

مواد و روشها:

در یک مطالعه تجربی، ۲۰ موش سوری نر 23 ± 2 گرمی که در شرایط با دمای کنترل شده و سیکل روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته و تغذیه با غذای استاندارد نگهداری می شدند، به مدت ۱۵ دقیقه در معرض 3600 mg/m^3 گاز خردل بصورت تنفسی قرار گرفتند. پس از یک ماه، از بین موشهای زنده مانده، به صورت تصادفی، یک گروه ۶ تایی بعنوان مورد و یک گروه ۶ تایی به عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد. ۸ موش سوری نر سالم نیز بدون مواجهه با گاز خردل، بعنوان شاهد منفی طرح در نظر گرفته شدند. شایان ذکر است کلیه مراحل کار با حیوانات در این طرح توسط کمیته اخلاق در پژوهش دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان مورد تایید قرار گرفته است.

در گروه مداخله، کلشی سین ابتدا بمدت یک هفته روزانه با غلظت 0.4 mg/lit در آب خوراکی داده شد و در هفته دوم دوز دارو نصف گردید. پس از گذشت یک هفته از قطع دارو، موشهای سه گروه

گاز خردل یا سولفور موستارد (SM) اولین بار در سال ۱۸۲۲ توسط Despretz ساخته شد و در جنگهای متعددی بعنوان سلاح شیمیایی مورد استفاده قرار گرفت. آخرین استفاده از آن در جنگ عراق با ایران در سالهای ۱۹۸۸-۱۹۸۳ گزارش شده است (۱).

SM یک ترکیب الکتروفیلیک و alkylating است که گروه الکیل خود را به پروتئینها و اسیدهای نوکلئیک سلولهای زنده و اجزای کمپلمان منتقل می کند و سبب ایجاد اتصالات متقاطع در مولکولهای هدف می شود (۲ و ۳) و به این ترتیب در نهایت منجر به مرگ سلولها می گردد (۴). سمیت گاز خردل بسیار بیشتر از قدرت آن در کشتن مصدومین در فاز حاد مواجهه است. در واقع بر اساس مطالعات انجام شده بر روی مصدومین شیمیایی گاز خردل در جنگ جهانی اول و جنگ ایران و عراق، ۳-۴٪ افراد در زمان مواجهه فوت کرده اند در حالیکه تمامی آنها به عوارض مواجهه با سم مبتلا شده اند. اندامهایی که در معرض تماس با سم هستند یعنی چشمها، راههای هوایی و پوست بیشترین آسیب را متحمل می شوند (۱).

سالها پس از مواجهه با SM همچنان ارگانهای مذکور دچار عوارض ناشی از سم هستند، بطوریکه در مطالعه خاطری و همکاران بر روی ۳۴۰۰۰ مجروح شیمیایی ایرانی ۱۳ تا ۲۰ سال پس از مواجهه، شایعترین عارضه دیررس مجروحان در ریهها (۴۲/۵٪) سپس در چشمها (۳۹٪) و پوست (۲۴/۵٪) گزارش شده است (۵). مشکلات ریوی مهمترین علت ناتوانی بلند مدت در مجروحان شیمیایی گاز خردل هستند (۱). با این وجود متاسفانه در حال حاضر هیچ پروتکل درمانی برای آسیبهای ریوی ناشی از گاز خردل وجود ندارد.

از سوی دیگر با توجه به نقش اثبات شده استرس اکسیداتیو در پاتوژنز التهاب بافتی (۶)، در آسیب دیررس ناشی از گاز خردل نیز با توجه به پایدار بودن فرآیند التهاب در مجاری تنفسی تحتانی (۷) و پیشرونده بودن سیر بیماری (۸) احتمال دخیل بودن استرس اکسیداتیو و گونههای فعال اکسیژن دار و کمبود آنتی اکسیدانهای دفاعی بدن در مقابل آنها مطرح می باشد و بنابراین داروهایی که بتوانند از شدت استرس اکسیداتیو بکاهند در جلوگیری از پیشرفت آسیب و با درمان عوارض دیررس ریوی مجروحان می توانند موثر

نتایج:

بر اساس نتایج حاصل از آزمون کولموگروف - اسمیرنوف برای برآورد نرمال بودن توزیع داده‌ها تنها هیدروکسی پرولین از توزیع نرمال پیروی نمی‌کرد. در گروه شاهد مثبت در مقایسه با نمونه‌های نرمال، درصد فضای آلوتولی کاهش ($P \text{ value} < 0/05$) و ارتشاح سلول‌های لنفوسیتی ($P \text{ value} < 0/05$)، مقدار هیدروکسی پرولین بافت ریه ($P \text{ value} < 0/05$) و غلظت H_2O_2 سرم ($P \text{ value} < 0/05$) افزایش یافته بود. همچنین ویتامین C در سرم موش‌های شاهد مثبت کمتر از نمونه‌های نرمال بود ($P \text{ value} < 0/001$). فعالیت اختصاصی آنزیم کاتالاز نیز در این موشها در مقایسه با گروه شاهد منفی کاهش یافته بود؛ اگرچه این کاهش در سطح معنی دار نبود.

در گروه دریافت کننده کلشی سین مقدار هیدروکسی پرولین بافت ریه و غلظت سرمی H_2O_2 در مقایسه با گروه شاهد مثبت به صورت معنی دار کاهش یافته بود ($P \text{ value} < 0/05$). علاوه بر این افزایش معنی دار در فعالیت اختصاصی آنزیم کاتالاز و غلظت ویتامین C سرم در این گروه نسبت به گروه شاهد مثبت مشاهده گردید ($P \text{ val} < 0/05$). ارتشاح لنفوسیتها در گروه دریافت کننده کلشی سین در مقایسه با شاهد مثبت کاهش یافته بود؛ گرچه این تفاوت در حد معنی دار نبود. مقادیر $Mean \pm SD$ درصد فضای آلوتولی، هیدروکسی پرولین واحد وزن ریه، درصد ارتشاح لنفوسیتها در مقایسه با سایر سلولهای التهابی، غلظت سرمی H_2O_2 ، ویتامین C و فعالیت اختصاصی آنزیم کاتالاز در گروههای مختلف در جدول شماره یک ثبت گردیده است.

sacrifice شد و خونگیری انجام پذیرفت. ریه راست برای تهیه مقاطع میکروسکوپی و ریه چپ برای بررسی محتوای هیدروکسی پرولین برداشته شد. ریه چپ موشها برای خشک شدن بمدت ۶ ساعت در دمای $90^\circ C$ قرار داده و سپس توزین شد. برای هیدرولیز کلاژن، ریه‌ها در اسید کلریدریک ۶ نرمال و دمای $110^\circ C$ بمدت ۱۲ ساعت قرار داده شدند و به روش Woessner مقدار هیدروکسی پرولین آنها تعیین گردید (۱۲). پس از انجام مراحل آماده سازی بافت و تهیه برش از ریه موشها و رنگ آمیزی H&E، با استفاده از برنامه کامپیوتری matlab درصد فضای آلوتولی آنها تعیین شد. علاوه بر آن لامهای تهیه شده توسط پاتولوژیست بررسی و شمارش افتراقی سلولهای التهابی در بافت ریه انجام شد. در نمونه‌های سرم موشها، اندازه گیری H_2O_2 به روش wolff (۱۳) و ویتامین C به روش Roe و Kuether (۱۴) و کاتالاز به روش Aebi (۱۵) انجام گردید.

در نهایت آنالیز داده‌ها توسط نرم افزار SPSS 13 صورت گرفت. با استفاده از آزمون آماری کولموگروف - اسمیرنوف پیروی داده‌ها از توزیع نرمال بررسی شد. بر این اساس برای مقایسه متغیرهایی که از توزیع نرمال پیروی می‌کردند از آزمون آماری ANOVA و برای سایر موارد از آزمون نان پارامتریک Kruskal wallis استفاده شد. علاوه بر این جهت تعیین اختلاف بین گروهها از آزمون Tukey-HSD post hoc استفاده گردید. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده است. P-value کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

جدول شماره یک: $Mean \pm SD$ درصد فضای آلوتولی، هیدروکسی پرولین واحد وزن ریه، درصد ارتشاح لنفوسیتها در مقایسه با سایر سلولهای التهابی، غلظت H_2O_2 ، ویتامین C و کاتالاز در گروههای مختلف

| گروه‌ها | شاخصها | شاهد منفی | شاهد مثبت | کلشی سین |
|---|--------|-------------------|------------------|------------------|
| درصد فضای آلوتولی | | $60/40 \pm 1/74$ | $56/96 \pm 3/00$ | $54/53 \pm 1/13$ |
| هیدروکسی پرولین واحد وزن ریه (mg/g) | | $6/68 \pm 0/42$ | $7/50 \pm 1/08$ | $6/97 \pm 0/94$ |
| درصد ارتشاح لنفوسیتها در مقایسه با سایر سلولهای التهابی | | $4/8 \pm 2/17$ | $12 \pm 5/7$ | $7/7 \pm 5/9$ |
| H_2O_2 (μM) | | $8/95 \pm 1/95$ | $10/01 \pm 0/45$ | $6/46 \pm 0/31$ |
| ویتامین C (mg/dl) | | $34/25 \pm 17/37$ | $16/84 \pm 2/95$ | $25/02 \pm 4/32$ |
| کاتالاز ($\mu mol H_2O_2$ decomposed/ min) | | $10/5 \pm 0/5$ | $5/7 \pm 0/7$ | $13 \pm 0/8$ |

بحث و نتیجه گیری:

مشکلات ریوی مهمترین علت ناتوانی بلند مدت مجروحان شیمیایی هستند (۱). بر اساس نتایج یک مطالعه بر روی ۱۹۷ سرباز ایرانی ۱۰ سال پس از مواجهه با گاز خردل، عوارض ریوی شامل برونشیت مزمن (۵۸٪)، فیبروز ریوی (۱۲٪)، آسم (۱۰٪)، باریک شدن راههای هوایی بزرگ (۹٪) و برونشکتازی (۸٪) می باشد (۱۶).

نتایج مطالعه حاضر نشاندهنده کاهش معنی دار درصد فضای آلوئولی در گروه شاهد مثبت (دریافت کننده گاز خردل) نسبت به گروه شاهد منفی است که می تواند به دو علت باشد؛ اول ارتشاح سلولهای التهابی و دوم افزایش کلاژن بافتی و ایجاد فیروز. در مطالعه حاضر در نمونه های پاتولوژی بررسی شده ارتشاح لنفوسیتها افزایش یافته است، علاوه بر آن افزایش معنی داری در محتوای هیدروکسی پرولین در واحد وزن ریه در گروه شاهد مثبت نسبت به گروه شاهد منفی مشاهده شد. نتایج حاصل دال بر بروز التهاب مزمن بافت ریه و به دنبال آن، رسوب کلاژن و بروز فیبروز ریوی ناشی از تماس استنشاقی با SM در مدل حیوانی می باشد.

این در حالی است که اگر چه فیبروز ریوی در بسیاری از مطالعات به عنوان عارضه دیررس ریوی در مصدومین گاز خردل شناخته شده است (۲۳-۱۷)؛ با این حال در بررسی های اخیر انجام شده این عارضه ریوی مورد تردید قرار گرفته و برونشبولیت به عنوان عارضه دیررس در این مصدومین مطرح شده است (۲۷-۲۴). با در نظر گرفتن نتایج مطالعه حاضر و افزایش کلاژن بافتی در موشهای مواجهه یافته با موستارد، به نظر می رسد بتوان فیبروز ریوی را به عنوان عارضه گاز خردل مطرح نمود؛ هر چند مطالعات تکمیلی در نمونه های انسانی نمی تواند شواهد قطعی تری در این زمینه فراهم نماید.

مقدار H_2O_2 سرم موشهای شاهد مثبت، افزایش معنی داری را نسبت به گروه سالم نشان داد. پراکسید هیدروژن از طریق واکنش دیسموتاسیون توسط آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) تولید می شود (۲۸)، با توجه به مطالعه انجام شده توسط Buczynski و Gnitecki که حاکی از افزایش فعالیت SOD در سلولهای پلاکت پس از مواجهه *in vitro* با گاز خردل می باشد (۲۹)؛ به نظر می رسد

بتوان افزایش تولید رادیکال سوپر اکسید که منجر به افزایش فعالیت آنزیم SOD و به دنبال آن، افزایش غلظت H_2O_2 شده است را به عنوان مکانیسم SM در ایجاد عوارض دیررس مطرح نمود. این در حالی است که با در نظر گرفتن عملکرد اختصاصی آنزیم کاتالاز یعنی از بین بردن پراکسید هیدروژن و تبدیل آن به آب و اکسیژن، می توان کاهش فعالیت این آنزیم را نیز به عنوان علت افزایش غلظت H_2O_2 در نمونه های سرم موشهای مواجهه یافته با گاز خردل مطرح کرد. بر این اساس پیشنهاد می گردد که در مطالعات بعدی مقادیر رادیکال سوپر اکسید و فعالیت آنزیم SOD سرم در مدل دیررس عوارض ناشی از SM اندازه گیری شود تا بدین وسیله اطلاعات دقیقتری در حیطه مکانیسم اثر گاز خردل در ایجاد عوارض دیررس ریوی فراهم گردد.

همانطور که در نتایج حاصل از این مطالعه نیز مشهود است، کاهش معنی دار در غلظت ویتامین C در موشهای مواجهه یافته با SM در مقایسه با گروه کنترل دیده می شود که کاهش فرم احیای ویتامین C را می توان نشأت گرفته از افزایش فرآیند استرس اکسیداتیو دانست. از آنجایی که ویتامین C مهمترین ماده آنتی اکسیدان موجود در راههای هوایی است (۳۰) کمبود آن به دنبال مواجهه با SM می تواند آثار مخرب قابل توجهی داشته باشد.

بنابر نتایج مطالعه حاضر تجویز داروی کلشی سین در موشهای مواجهه یافته با موستارد، منجر به کاهش معنی دار در غلظت هیدروکسی پرولین بافتی به عنوان شاخص فیبروز ریوی گشته است. با توجه به کاهش در صد ارتشاح سلولهای لنفوسیت، می توان اثر ضدالتهابی این دارو را به عنوان مکانیسم دارو در کاهش فیروز بافتی مطرح نمود؛ این در حالی است که با توجه به عدم کارایی سایر داروهای ضد التهاب در درمان عوارض دیررس ریوی مصدومین مواجهه یافته با موستارد، به نظر می رسد مکانیسمهای دیگری غیر از خاصیت ضد التهابی این دارو در کاهش عوارض دیررس ریوی توسط کلشی سین موثر بوده اند.

بر این اساس افزایش ویتامین C بعنوان یک آنتی اکسیدان، همچنین افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز و به دنبال آن کاهش غلظت H_2O_2 سرمی و در نهایت کاهش استرس اکسیداتیو را میتوان به عنوان

مقابل داروی کلشی سین به واسطه کاهش شدت استرس اکسیداتیو ناشی از SM اثرات درمانی خود را ظاهر می‌سازد. هر چند با در نظر گرفتن مطالب ضد و نقیض موجود در مورد نقش آنتی اکسیدانی کلشی سین، مطالعات بیشتری در زمینه نقش این دارو و مکانیسم آن در مهار روند فیبروز مورد نیاز است. از سوی دیگر همانطور که قبلاً نیز به آن اشاره شد، با توجه به مطالعات اخیر انجام شده در مورد عوارض دیررس ریوی مصدومین گاز خردل و مورد تردید واقع شدن فیبروز ریوی در این مصدومین (۴۱)، مطالعات تکمیلی در مصدومین و نمونه‌های حیوانی می‌تواند به تشخیص قطعی اختلالات ریوی دیررس گاز خردل منجر گردد. علاوه بر این با در نظر گرفتن تعداد جانبازان شیمیایی مبتلا به عوارض دیررس ریوی در کشور ما، با انجام مطالعات تکمیلی جهت بررسی تاثیر داروی کلشی سین در درمان سایر عوارض دیررس ریوی گاز خردل، می‌توان گامی موثر در راستای درمان و جلوگیری از پیشرفت ضایعات ریوی در این بیماران برداشت.

References

- Balali-Mood M, Hefazi M. The pharmacology, toxicology, and medical treatment of sulfur mustard poisoning. *Fundam Clin Pharmacol* 2005; 19: 297-315.
- Papirmeister B, Feister AJ, Rabinson SI, Ford RD. Medical defense against mustard gas: toxic mechanism and pharmacological implications. U.S. CRC Press 1991. p. 180-99.
- Mieer HL, Millard CB. Alterations in human Lymphocyte DNA caused by sulfur mustard can be mitigated by selective inhibitors of poly (ADP-ribose) Polymerase. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1404: 367-76.
- Moser J, Meier HL. Comparison of cell in

مکانیسم داروی کلشی سین در کاهش عوارض دیررس ریوی ناشی از گاز خردل مطرح کرد.

یافته‌های مطالعه حاضر تعیین کننده نقش آنتی اکسیدانی کلشی سین در سرم موش‌های تماس یافته با گاز خردل می‌باشد. خواص آنتی اکسیدانی این دارو برای اولین بار توسط Mourelle و همکاران در سال ۱۹۸۹ مطرح شد (۳۱). این ویژگی بعدها در سال ۱۹۹۴ توسط Muriel و Suarez مورد تایید قرار گرفت (۳۲). این در حالی است که در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۰ توسط Das و همکاران بر روی مدل حیوانی سیروز کبیدی انجام شد، خاصیت آنتی اکسیدانی کلشی سین مورد تردید واقع گشت (۳۳). ولی در مجموع با توجه به یافته‌های مطالعه حاضر و نتایج بدست آمده از مطالعات قبلی، به نظر می‌رسد داروی کلشی سین علاوه بر اینکه به عنوان یک داروی سیتوتوکسیک مطرح می‌باشد، دارای خواص آنتی اکسیدانی نیز می‌باشد و می‌تواند اثرات درمانی خود را با این مکانیسم اعمال نماید.

شایان ذکر است تا کنون خواص آنتی فیبروتیک کلشی سین به مهار تقسیم میتوز در سلولها و تحریک آنزیم کلاژناز توسط این دارو، همچنین مهار تاثیرات فیبروتیک‌زای فاکتور رشد مشتق از پلاکت (PDGF) (۳۴) و فاکتورهای کموتاکتیک مانند TGF (که از فاکتورهای موثر در فعالیت فیبروبلاستها می‌باشد)، نسبت داده می‌شد. بر این اساس مطالعه حاضر اولین مطالعه ای است که به بررسی نقش آنتی اکسیدانی این دارو در مهار فیبروز ریوی ناشی از گاز خردل پرداخته است (۳۵-۳۷).

در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۰۲ توسط Gupta و Kumar انجام شده است، تجویز داخل بطنی کلشی سین در مغز رات تغییری در سطح کاتالاز در راتهای مواجهه یافته با دارو ایجاد نکرده است (۳۸)؛ که علت آنرا می‌توان ناشی از فعالیت بسیار پایین کاتالاز در بافت مغز دانست (۳۹). از سوی دیگر افزایش آنزیم کاتالاز در گیاهان تیمار شده با داروی کلشی سین، منجر به افزایش فعالیت آنزیم در این گیاهان گشته است (۴۰).

در مجموع می‌توان چنین نتیجه گیری کرد که SM در آسیب دیررس خود نیز منجر به افزایش استرس اکسیداتیو می‌گردد و در

- development of interstitial fibrosis in renal allografts of recipients with familial Mediterranean fever? *Transplant Proc* 2006; 38: 473-6.
12. Woessner J. The determination Angiotensin II of hydroxyproline in tissue and protein samples containing Small proportion of this imino acid. *Arch Biochem Biophys* 1961; 93: 440-7.
13. Wolff SP. Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measure of hydroperoxides In: Packer L editor. *Methods in enzymology*. vol.233, Part C. San Diego: Academic Press; 1994. p. 183-6.
14. Roe JH, Kuether CA. The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative of dehydroascorbic acid. *J Biol Chem* 1943; 147: 399-407.
15. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-5.
16. Emad A, Rezaian GR. The diversity of effects of sulphur mustard gas inhalation on respiratory system 10 years after a single heavy exposure: analysis of 197 cases. *Chest* 1997; 112: 734-8.
17. Hoesel LM, Flierl MA, Niederbichler AD, Rittirsch D, McClintock SD, Reuben JS, et al. Ability of antioxidant liposomes to prevent acute and progressive pulmonary injury. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10: 973-81.
18. Emad A, Emad Y. Increased granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) levels in BAL fluid from patients with sulfur mustard gas-induced pulmonary fibrosis. *J Aerosol Med* 2007; 20: 352-60.
- sulfur mustard – induced death of keratocytes and lymphocytes. *J APPL Toxicol* 2000; 1: 23-30.
5. Khateri S, Ghanei M, Keshavarz S, Soroush M, Haines D. Incidence of lung, eye, and skin lesions as late complications in 34,000 Iranians with wartime exposure to mustard agent. *J Occup Environ. Med* 2003; 45: 1136-43.
6. Mitchell RN, Cotran RC. Cell injury, adaptation and death. In: Robbins Basic pathology edited by Kumar V, Cotran R, Robbins SL. Philadelphia, W.B. Saunders company; 2003. P. 9-11.
7. Emad A, Rezaian GR. Immunoglobulins and cellular constituents of the BAL fluid of patients with sulphur mustard gas-induced pulmonary fibrosis. *Chest* 1999; 115: 1346-51.
8. Aghanouri R, Ghanei M, Aslani J, Keivani-Amine H, Rastegar F, Karkhane A. Fibrogenic cytokine levels in bronchoalveolar lavage aspirates 15 years after exposure to sulphur mustard. *Am J Physiol Lung Cell Mol Hysiol* 2004; 287: 1160-64.
9. Wagner W, Khanna P, Furst DE. Nonsteroidal anti inflammatory drugs, disease-modifying antirheumatic drugs, nonopioid analgesics & drugs used in gout In: *Basic & Clinical Pharmacology* edited by Katzung BG. Boston, The Mc Graw-Hill companies; 2004. p. 597.
10. Talmadge E, King JR, Schwarz MI. Idiopathic Interstitial pneumonia. In: Murray Jf, Nadel JA, Mason RJ, Boushey HA editors. *Textbook of respiratory medicine*. Philadelphia, W.B.Saunders Company; 2000. p.1680-3.
11. Ozdemir BH, Ozdemir FN, Sezer S, Sar A, Haberal M. Does colchicine have an antifibrotic effect on

- years. *Pulmonary Pharma Therap* 2006; 19: 148–53.
27. Ghanei M, Shohrati M, Harandi AA, Eshraghi M, Aslani J, Alaeddini F, et al. Inhaled corticosteroids and long-acting beta 2-agonists in treatment of patients with chronic bronchiolitis following exposure to sulfur mustard. *Inhal Toxicol* 2007; 19: 889-94.
28. Mayes PA, Botham KM. Biologic oxidation. In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW editors. *Harper's illustrated Biochemistry*. NewYork, Mc Graw-Hill companies; 2003. p. 91.
29. Buczynski A, Gnitecki W. Effect of mustard gas on supraoxide diSMutase activity and the level of malonyl dialdehyde: in vitro studies. *Int J Occup Med Environ Health* 1999; 12: 119-22.
30. Siwik DA, Pagano PJ, Colucci WS. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280: 53-60.
31. Mourelle M, Friginals R, Rodriguez L, Favari L, Perez-Alvarez V. Protective effect of colchicine against acute liver damage. *Life Sci* 1989; 45: 891–900.
32. Muriel P, Suarez OR. Role of lipid peroxidation in biliary obstruction in the rat. *J Appl Toxicol* 1994; 14: 423–6.
33. Das D, Pemberton PW, Burrows PC, Gordon C, SMith A, McMahan RFT, Warnes TW. Antioxidant properties of colchicine in acute carbon tetrachloride induced rat liver injury and its role in the resolution of established cirrhosis. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1502: 351–62.
34. Peterson TC, Isbrucker RA, Hooper ML. In vitro effect of platelet-derived growth factor on
19. Emad A, Emad Y. Relationship Between Eosinophilia and Levels of Chemokines (CCL5 and CCL11) and IL-5 in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Patients with Mustard Gas-induced Pulmonary Fibrosis. *J Clin Immunol* 2007; 28.
20. 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: 38-43.
21. Balali-Mood M, Hefazi M. Comparison of early and late toxic effects of sulfur mustard in Iranian veterans. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006; 99 :273-82.
22. Hefazi M, Attaran D, Mahmoudi M, Balali-Mood M. Late respiratory complications of mustard gas poisoning in Iranian veterans. *Inhal Toxicol* 2005; 17: 587-92.
23. Aghanouri R, Ghanei M, Aslani J, Keivani-Amine H, Rastegar F, Karkhane A. Fibrogenic cytokine levels in bronchoalveolar lavage aspirates 15 years after exposure to sulfur mustard. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287: 1160-4.
24. Ghanei M, Mokhtari M, Mir Mohammad M, Aslani J. Bronchiolitis obliterans following exposure to sulfur mustard: chest high resolution computed tomography. *Eur J Radiol* 2004; 52: 164–9.
25. Ghanei M, Tazelaar HD, Chilosi M, Harandi AA, Peyman M, Akbari HH, et al. An International collaborative pathologic study of surgical lung biopsies from mustard gas-exposed patients. *Res Med* 2008; 102: 825–30.
26. Ghanei M, Panahi Y, Mojtahedzadeh M, Khalili AH, Aslani J. Effect of gamma interferon on lung function of mustard gas exposed patients, after 15

- fibroproliferation and effect of cytokine antagonists. *Immunopharmacol* 1994; 28: 259.
35. Entzian P, Schlaak M, Seitzer U. Antiinflammatory and antifibrotic properties of colchicine: implications for idiopathic pulmonary fibrosis. *Lung* 1997; 175: 41.
36. Rennard SI, Bitterman PB, Ozaki T. Colchicine suppresses the release of fibroblast growth factors from alveolar macrophages in vitro: the basis of a possible therapeutic approach to the fibrotic disorders. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137:181.
37. Diegelmann RF, Peterkofsky B. Inhibition of collagen secretion from bone and cultured fibroblasts by microtubular disruptive drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972; 69: 892.
38. Veerendra Kumar MH, Gupta YK. Intracerebroventricular administration of colchicine produces cognitive impairment associated with oxidative stress in rats. *Pharm Biochem Behav* 2002; 73: 565–71.
39. Moreno S, Meganini E. Immunocytochemical localization of catalase in rat brain. *Soc Neurosci Abstr* 1992; 18: 673.
40. Drazkiewicz M, Skózyńska-Polit E, Wanke M, Swiezewska E. The activity of antioxidant enzymes in *Arabidopsis thaliana* exposed to colchicine and H₂O₂. *Cell Mol Biol Lett* 2003; 8: 777-81.
41. Ghanei M, Harandi AA. Long term consequences from exposure to sulfur mustard: a review. *Inhal Toxicol* 2007; 19: 451-6.