اثرهورمون های استروئیدی جنسی (۱۷ بتا استرادیول و ۵- آلفا دی هیدرو تستوسترون) بر ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای ریوی رت تحریک شده با TGF-β

کاظم احمدی Ph.D.[☆♦]، قاسم سلگی M.Sc.[☆]

☆دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی و مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی

♦ آدرس مکاتبه: تهران صندوق پستی: ۵۴۶-۱۹۹۴۵، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، دانشکده پزشکی،گروه ایمونولوژی و مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی

پست الکترونیک: Email: kahmadi@bmsu.ac.ir

چکیده

دریافت مقاله: ۸۲/۹/۲۴، پذیرش مقاله: ۸۳/۵/۶

* **هدف:** بررسی اثر ۱۷- بتااسترادیول و ۵- آلفا دی هیدروتستوسترون بر ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای ریوی تحریک شده با TGF-β

* **مواد و روشها:** ماکروفاژهای ریوی با روش لاواژ ریه از رت های نرسالم با سن ۱۰-۸ هفته به دست آمد. ماکروفاژهای ریوی به تعداد 1×10^{5} در یک میلی‌لیتر محیط کشت RPMI۱۶۴۰ بدون فنل رد حاوی ۱۰درصد FCS به هر چاهک پلیت ۲۴ خانه اضافه و به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. پس از مدت مذکور، سلولهای غیر چسبیده (غیر ماکروفاژ) با سه بار شستشو خارج و مجددا یک میلی‌لیتر محیط کشت کامل بدون فنل رد، حاوی LPS 10μg/ml و IFN-γ100u/mlو غلظتهای مختلف هورمونهای ۱۷- بتا استرادیول و یا ۵- آلفا دی‌هیدروتستوسترون در حضور یا غیاب TGF-β را به هر چاهک افزوده و انکوباسیون در شرایط فوق به مدت ۲۴ ساعت دیگر ادامه یافت. سپس مایع رویی را برداشته و پس از سانتریفوژ ، مقدار نیتریت موجود در محلول رویی به عنوان اندیکاتوری از نیتریک اکساید به روش گریس اندازه‌گیری شد.

* **یافته ها:** نتایج نشان داد که ترشح نیتریک اکساید در پاسخ به ۵- آلفا دی‌هیدروتستوسترون و در حضور TGF-β کاهش یافته و حداقل و حداکثر کاهش به ترتیب در پاسخ به 1×10^{-10} و 1×10^{-6} مولار به دست آمد. همچنین نتایج نشان داد که این اثر کاهشی TGF-β بر ترشح نیتریک اکساید در پاسخ به هورمون ۱۷- بتا استرادیول بیشتر نمایان بوده به طوری که حداقل ۳۴/۵۲درصد و حداکثر ۶۸/۵۷درصد به ترتیب در پاسخ به 1×10^{-10} و 1×10^{-6} مولار به دست آمد.

* **نتیجه گیری:** به نظر می‌رسد که قسمتی از روند التهاب ریوی که وابسته به TGF-β است احتمالا از طریق نیتریک اکساید اعمال شده و هورمونهای جنسی نیز می‌تواند در این حالت دخیل باشند.

کل واژگان: ماکروفاژهای ریوی، نیتریک اکساید، ۱۷- بتااستردیول، ۵- آلفا دی هیدروتستوسترون

نشریه پزشکی یاخته، سال ششم، تابستان ۸۳، شمارهٔ ۲۲، صفحات ۸۰-۷۵

مقدمه

ماکروفاژهای ریوی با ترشح مواد پیش التهابی، مولکولهای تنظیم کننده ایمنی، پردازش آنتی‌ژن، تجمع فیبرین، فاگوسیتوز، ترشح مواد وابسته به اکسیژن نظیر سوپر اکساید (۱) و نیتروژن (نیتریک اکساید) (۲، ۳) نقش مهمی را در دفاع میزبان به عهده دارد. نیتریک اکساید علاوه بر دفاع غیر اختصاصی علیه پاتوژنهای استنشاقی، نقش مهمی در آسیب ریوی نیز به عهده دارد (۴). به منظور سنتز و ترشح نیتریک اکساید، آرژنین به عنوان سوبسترا برای آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز مورد نیاز است. فعالیت این آنزیم در ماکروفاژها و سلولهای ایمنی وابسته به تحریک با ماده محرکی مثل LPS وIFN-γ (۵) است. از طرفی علاوه بر نقشی که نیتریک اکساید در دفاع میزبان دارد، افزایش ترشح آن ممکن است منجر به گشادی عروق، ادم و سایتوتوکسیسیتی شده و احتمالا مسئول فرایند اعمال سایتوکاین ها درریه باشد (۶). شواهد موجود نشان می‌دهند که آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز در سلولهای اپی تلیال و ماکروفاژهای افراد سالم بروز نیافته ولی در افراد آسمی احتمالا تحت تاثیر سایتوکاین ها بروز می‌یابد (۷، ۸). در این رابطه IL-4 اولین سایتوکاینی است که نقش آن در مکانیسم تنظیم نیتریک اکساید شناخته شد (۹). با تثبیت اینکه ماکروفاژها اگر قبل از تحریک با LPS وIFN-γ در معرض IL-4 قرار گیرند، قادر به کشتن انگل لیشمانیا نیستند، نقش مهاری IL-4 بیشتر مشخص گردید (۱۰، ۱۱). همچنین مطالعات نشان داده اند که TGF-β اثر مهاری بر ترشح نیتریک اکساید داشته (۱۲) در حالی که فاکتور مهار کننده مهاجرت (MIF) اثر افزایشی بر ترشح آن دارد

Archive of SID

www.SID.ir

(۱۳). مطالعات نشان داده که چنانچه ماکروفاژها بطور توام در معرض rMIF و IL-10 قرار گیرند، IL-10 باعث توقف اثر کشندگی rMIF بر انگل لیشمانیای داخل منوسیت های انسانی شده و باعث توقف ترشح نیتریک اکساید می‌شود (۱۴). مطالعات دیگر نشان داده که هورمونهای استروئیدی جنسی نیز در حالت وابسته به دوز، ترشح نیتریک اکساید و همچنین سایتوکاینهای واسطه را در هر دو جنس نر و ماده تنظیم می‌کنند (۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۰).

Moncada نیز (۲۱) گزارش نمود که نیتریک اکساید در بیماریهای التهابی نقش داشته و افزایش مقدار نیتریت در مایع سینوویال و سرم بیماران روماتوئیدی تایید شده است (۲۲). به نظر می‌رسد که عمل نیتریک اکساید در این فرایند وابسته به نقش آن در مکانیسم های سایتوتوکسیک ماکروفاژهای فعال شده و اثرات ضد تکثیر سلولی آن باشد.

هدف از این تحقیق، این بود که بدانیم آیا ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای ریوی در پاسخ به هورمونهای جنسی استرویدی در حضور یا غیاب TGF-β تغییر می‌یابد؟

مواد و روشها

ماکروفاژهای ریوی با روش لاواژ ریه به دست آمد. برای این کار حیوان به وسیله ماده بیهوش کننده کشته و ۱۰ میلی‌لیتر PBS سرد از طریق نای به داخل ریه تزریق شد. پس از آسپیره کردن مایع حاوی سلول، نمونه ها با دور g ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و رسوب سلولی به این طریق سه مرتبه شستشو داده شد. پس از شمارش ماکروفاژها، سوسپانسیون سلولی به تعداد 1×10^{5} ماکروفاژ در میلی‌لیتر محلول متشکل از محیط RPMI ۱۶۴۰ بدون فنل رد و حاوی ۱۰ درصد FCS و ۱۶mg/ml پنی‌سیلین به حجم یک میلی‌لیتر به هر چاهک پلیت ۲۴ خانه اضافه گردید.

سلولها به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و۵درصد CO_2 در هوا انکوبه شده و پس از آن مایع رویی را برداشته و سه بار با PBS گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد شستشو داده تا سلولهای غیر ماکروفاژی از پلیت برداشته شود. مقدار یک میلی‌لیتر RPMI ۱۶۴۰ حاوی ۱۰ درصد FCS، مقدار کافی آنتی بیوتیک و ۱۰μg /ml LPS (۱۴) و IFN-γ۱۰۰U/ml به هر چاهک افزوده گردید. به منظور به دست آوردن غلظت مناسب TGF-β مورد استفاده ابتدا آزمایش در حضور غلظتهای مختلف TGF-βانجام گرفت. پس از به دست آوردن غلظت مناسب TGF-β در آزمایشات بعدی محیط کشت کامل RPMI ۱۶۴۰ حاوی ۱۰درصد FCS مقدار کافی آنتی‌بیوتیک و ۱۰μg /ml LPS (۱۴) و IFN-γ۱۰۰U/ml و ۱۷- بتا استرادیول و یا ۵- آلفا دی هیدروتستوسترون با غلظتهای 1×10^{-6} الی 1×10^{-12} مولاردر حضور یا غیاب ۱۰۰ واحد TGF-β به هر چاهک اضافه و پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت مجددا در شرایط فوق انکوبه شدند .سپس مایع رویی را برداشته و پس از سانتریفوژ نمودن مقدار نیتریت به عنوان اندیکاتوری از نیتریک اکساید با روش گریس (۲۳) اندازه‌گیری شد. بدین منظور مقدار ۵۰ میکرولیتر از مایع رویی به علاوه ۵۰ میکرولیتر از محلول گریس (سولفانیل آمید ۱درصد در اسید فسفریک ۲/۵ درصد، N – نفتیل‌اتیل‌دی آمین دی هیدرو کلراید ۰/۱ درصد) مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در حرارت اتاق قرار گرفت. میزان جذب نوری به وسیله دستگاه الایزا ریدر (Multiskan) در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت شد. غلظت نیتریت موجود در مایع رویی، پس از رسم منحنی استاندارد مربوط به غلظت های مختلف نیتریت سدیم، محاسبه شد (۲۳).

نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS و روش آماری Npar Test (Mann-Whitney) تجزیه وتحلیل آماری شد.

یافته‌ها

نتایج نشان داد که TGF-β اثر کاهشی بر ترشح نیتریک اکساید داشته و حداکثر کاهش در پاسخ به TGF-β ۱۶۰ U/ml به دست آمد (نمودار ۱) لذا پس از سه بار تکرار آزمایش غلظت مناسب (اپتیمم) ۱۰۰ واحد در آزمایشات بعدی استفاده گردید. همچنین مشخص شد که ۱۷- بتا استرادیول رهایش نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای ریوی را کاهش داده به طوری که حداقل و حداکثر کاهش به ترتیب در پاسخ به 1×10^{-10} و 1×10^{-6} مولار ایجاد شد ($p<0.05$) (نمودار ۲). این کاهش در حضور ۱۰۰ واحد TGF-β بیشتر بود ($p<0.05$) (نمودار ۳، جدول ۱). به طور مثال جدول یک نشان می‌دهد که مقدار نیتریک اکساید در پاسخ به ۱۰۰ واحد TGF-β به مقدار ۳۰/۹۵ درصد کاهش و در حضور ۱ نانومولار ۱۷ بتا استرادیول ۱۲/۸۵ درصد کاهش داشته است.

جدول ۱: کاهش ترشح نیتریک اکساید (بر حسب درصد) تحت غلظتهای مختلف هورمون ۱۷ – بتا استرادیول تنها یا استفاده توام از ۱۰۰ واحد TGF-beta و غلظتهای مختلف هورمون ۱۷ – بتا استرادیول

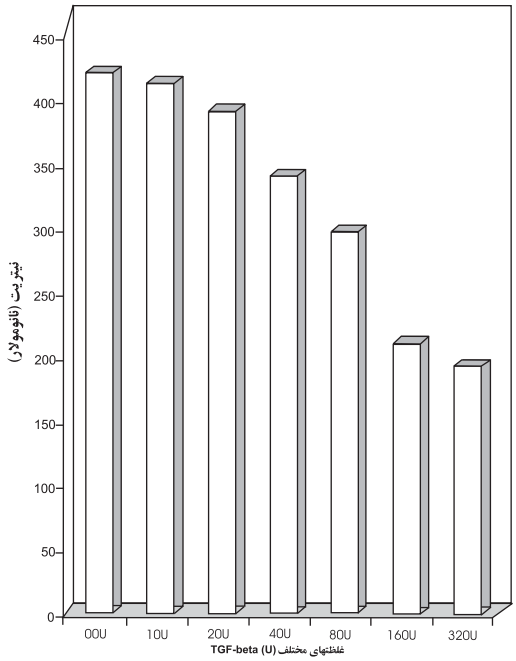
غلظت هورمون بر حسب مولار	کاهش ٪	
	۱۷- بتا استرادیول (فقط)	۱۷- بتا استرادیول و TGF-beta (توام)
1×10^{-12}	۰۰	۳۰/۹۵
1×10^{-11}	۱/۱۹	۳۴/۵۲
1×10^{-10}	۷/۱۴	۴۰
1×10^{-9}	۱۲/۸۵	۴۳/۸۰
1×10^{-8}	۱۹/۰۴	۵۰/۷
1×10^{-7}	۳۲/۸۵	۶۴/۲۸
1×10^{-6}	۳۶/۹۰	۶۸/۵۷

Archive of SID
www.SID.ir

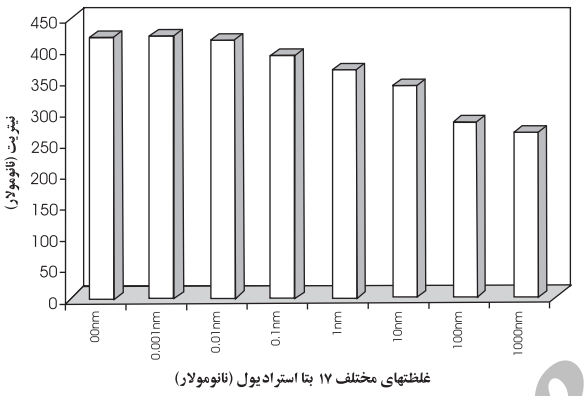
جدول ۲: افزایش ترشح نیتریک اکساید (بر حسب درصد) تحت غلظتهای مختلف هورمون ۵- آلفا دی هیدروتستوسترون تنها یا استفاده توام از ۱۰۰ واحد TGF-beta و علظتهای مختلف هورمون ۵ – آلفا دی هیدروتستوسترون

غلظت هورمون بر حسب مولار	افزایش ٪	
	۵- آلفا دی هیدروتستوسترون (فقط)	۵- آلفا دی هیدروتستوسترون و TGF-beta (توام)
۱×۱۰^{-۱۲}	۴/۲۸	(کاهش) ۲/۸۵
۱×۱۰^{-۱۱}	۷/۱۴	۰۰
۱×۱۰^{-۱۰}	۱۶/۶۶	۴/۷۶
۱×۱۰^{-۹}	۳۸/۰۹	۲۸/۵۷
۱×۱۰^{-۸}	۵۲/۳۸	۴۰/۴۷
۱×۱۰^{-۷}	۷۸/۰۹	۶۶/۶۶
۱×۱۰^{-۶}	۹۱/۶۶	۸۵/۷۱

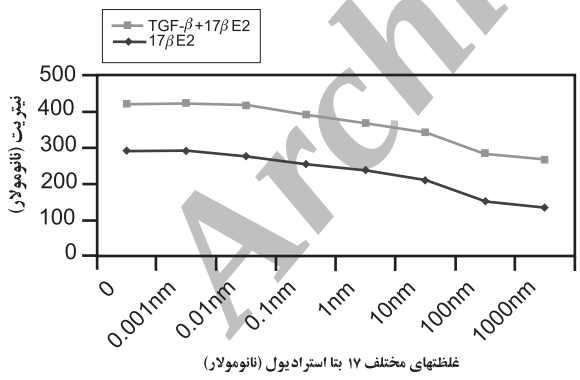
در حالی که وقتی این دو به صورت توام استفاده شد مقدار کاهش به ۴۳/۸درصد رسیده است. نتایج حاصل از اثر ۵- آلفا دی هیدروتستوسترون نشان داد که TGF-β اثر افزایشی هورمون فوق را در رهایش نیتریک اکساید کاهش داده است (نمودار ۴، ۵، ۶). حداقل و حداکثر کاهش به ترتیب در پاسخ به ۱×۱۰^{-۱۰} و ۱×۱۰^{-۶} مولار هورمون مردانه ایجاد شد ($P<0.02$). جدول ۲ اثر افزایشی۵- آلفا دی هیدروتستوسترون را در حضور یا غیاب TGF-β به صورت درصد نشان می‌دهد. به طور مثال ۵- آلفا دی هیدروتستوسترون در غلظت ۱×۱۰^{-۱۲} مولار افزایش ۴/۲۸ درصدی را در ترشح نیتریک اکساید داشته و در همین غلظت در حضورTGF-β کاهش ۲/۸۵ درصد را داشته است (جدول ۲).



نمودار ۱: اثر TGF-β بر ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای ریوی



نمودار ۲: اثر ۱۷ – بتا استرادیول بر ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای ریوی

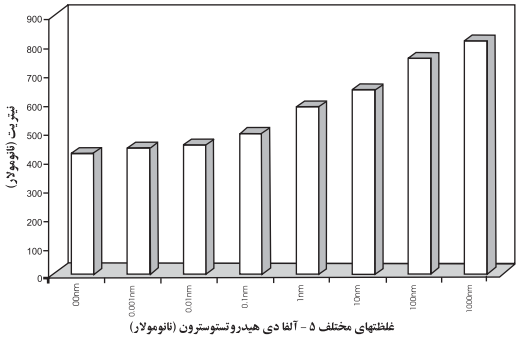


نمودار۳: اثر غلظتهای مختلف ۱۷ بتا استرادیول بر ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای ریوی در حضور یا عدم حضور مقدار ثابت TGF-β

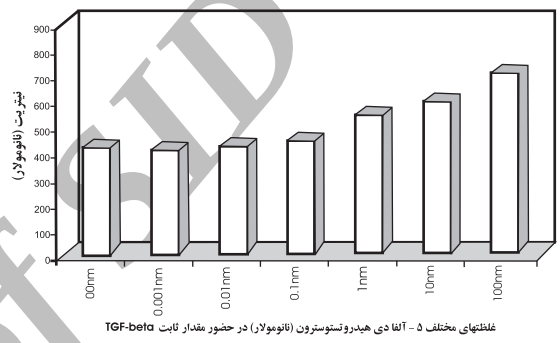
در حالی که در حضور TGF-β تنها، کاهش برابر با ۳۰/۹۵درصد بوده است. در غلظت ۱×۱۰^{-۱۱} مولار اثر افزایشی ۵- آلفا دی هیدروتستوسترون و اثر مهاری TGF-β برابری کرده و تغییری در سطح نیتریک اکساید مشاهده نمی‌شود (جدول ۲).

Archive of SID

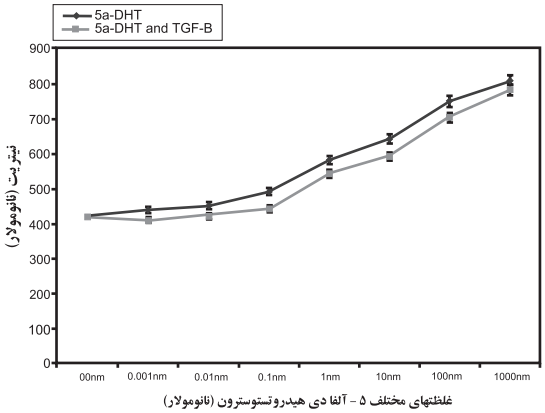
www.SID.ir



نمودار ۴: اثر ۵ – آلفا دی هیدروتستوسترون بر ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای ریوی



نمودار ۵: TGF-beta باعث کاهش اثر ۵ – آلفا دی هیدروتستوسترون بر ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای ریوی شد



نمودار ۶: اثر ۵ – آلفا دی هیدروتستوسترون بر ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای ریوی در حضور یا عدم حضور مقدار ثابت TGF-beta

بحث

مطالعات قبلی نشان داده که ۱۷- بتا استرادیول باعث کاهش ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی می‌شود در حالی که۵- آلفا دی هیدروتستوسترون باعث افزایش ترشح آن می‌گردد (۱۵، ۲۴، ۲۵، ۲۶، ۲۷) همچنین Dind و همکارانش (۱۲) نشان دادند که TGF-β بر ترشح نیتریک اکساید اثر مهاری دارد در حالی که IFN-γ اثر افزایشی دارد. در این مطالعه اثر هورمونهای جنسی استروییدی بر ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای ریوی در حضور یا غیاب TGF-βمورد مطالعه قرار گرفت. همان طور که در نمودار ۳ نشان داده شده، هورمون زنانه ۱۷- بتا استرادیول که خود به تنهایی قادر به کاهش ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی موش بوده است، وقتی به صورت توام با TGF-β استفاده شد توانسته باعث کاهش بیشتری در ترشح این رادیکال آزاد توسط ماکروفاژهای ریوی رت شود (جدول ۱). نتایج حاصل از این تحقیق با یافته‌های دیگران همخوانی داشته (۱۵، ۲۲) با این تفاوت که نوع ماکروفاژها در اینجا ریوی بوده و از اهمیت بیشتری برخوردار است.

تجربیات قبلی ما نشان داد که ۵- آلفادی هیدروتستوسترون باعث افزایش ترشح نیتریک اکساید می‌شود (۱۵، ۲۷). در این مطالعه نتایج نشان داد که TGF-βهمچنین قادر بوده است باعث کاهش اثر افزایشی ۵- آلفادی هیدروتستوسترون بر ترشح نیتریک اکساید شود (نمودار ۶، جدول ۲). ولی اثر کاهشی TGF-β ضعیف‌تر از اثر افزایشی ۵- آلفا دی هیدروتستوسترون بر ترشح آن بوده به طوری که TGF-βنتوانسته اثر افزایشی را به طور کامل مسدود و مقدار ترشح آن را به کمتر یا حداقل مساوی با مقدار ترشح آن در گروه کنترل (۴۲۰ نانو مول در هر چاهک) برساند. بلکه فقط توانسته با اثر افزایشی آن مقابله و ترشح آن را به کمتر از حد ماکزیمم برساند. نظر به اینکه نیتریک اکساید یکی از مواد دخیل در فرآیندهای التهابی است (۲۱، ۲۲) و معمولا از داروهای استروییدی جهت جلوگیری از التهاب استفاده می‌شود، لذا اثرات هورمونهای استروییدی در این حالت به خاصیت ضد التهابی آنها بر می‌گردد. از طرفی گزارشات نشان داده که نیتریک اکساید احتمالا در فرآیند ضایعات ریوی خصوصا فیبروز نقش دارد (۲۸). لذا با توجه به نقش تثبیت شده TGF-βدر فرآیند فیبروز ریه (۲۹) و اثرات مثبت IFN-γ در بهبود ضایعات ریوی ناشی از TGF-β می‌توان ارتباط این سایتوکاینها با ترشح نیتریک اکساید را نشان داد.

چون IFN-γ از یک طرف باعث افزایش ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی (۱۵) و ریوی می‌شود و از طرفی نشان داده شده که تجویز این فاکتور باعث بهبود روند التهاب در ریه و جلوگیری از پیشرفت فیبروز ریه می‌شود. این در حالی است که TGF-β از یک طرف باعث کاهش ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای ریوی در *in vitro* گردیده واز طرف دیگر در *in vivo* باعث افزایش روند التهاب در ریه شده و IFN-γ مخالف آن عمل می‌نماید (۲۸، ۲۹). لذا می‌توان پیشنهاد کرد که احتمالا اثر این دو سایتوکاین در روند التهاب از طریق ترشح نیتریک اکساید صورت می‌گیرد. همچنین در *in vivo* به دلیل تداخل سایتوکاینهای مترشحه از سلولهای T اثرات TGF-β بر ترشح نیتریک اکساید با اثر آن در *in vitro* احتمالا متفاوت است.

اثر هورمونهای جنسی در این فرایند از آن جهت حائز اهمیت است که تا کنون گزارشی مبنی بر تفاوت جنسی در فرآیند ضایعات

Archive of SID

www.SID.ir

ریوی ناشی از التهاب دیده نشده است، در حالی که مطالعات قبلی نشان داده که هر دو جنس در فرآیند ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی تفاوت معنی‌داری دارند (۱۵). ولی در یک جنس، تفاوت معنی‌داری در فرایند التهاب ریه پس از مواجهه با یک عامل آسیب رسان دیده شده است. هرچند هر دو هورمون زنانه و مردانه اثر متضادی در تحریک ترشح نیتریک اکساید دارند (۱۵، ۲۷) ولی TGF-β در حضور این دو هورمون اثر کاهشی خود بر ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای ریوی حفظ نموده است. لذا به نظر می‌رسد که قسمتی از روند التهاب ریوی که وابسته به TGF-β است احتمالا از طریق نیتریک اکساید اعمال شده و هورمونهای جنسی نیز می‌توانند در این حالت دخیل باشند.

References

1 .Brain JD: Mechanisms measurement and significant of lung macrophage function Environment, Health Persp, 1992; 97: 5-10

2. Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z, Rachilin EM: Nitric Oxide: a cytotoxic activated macrophage, effect to molecule. Biochem Biophys Res Commun. 1989; 157: 87-96

3. Jorens PJ, Matthys KE, Bult H: Modulation of Nitric Oxide synthase activity in macrophages. Med. Inflamm 1995; 4: 75-89

4. Jesch NK, Dorger M, Messmer K, Krombach F: Formation of Nitric Oxide by rat and hamster alveolar macrophages: an inter strain and inter species comparison. Toxicology Letters, 1988; (96,97), 47-51

۵. احمدی کاظم؛ اثر هورمانهای جنسی بر ترشح نیتریک اکساید توسط ماکرو فاژهای صفاقی موش . مجله پزشکی کوثر ۱۳۷۵؛ شماره (۲)۱، ۱۳۸-۱۲۹

6. Clancy RM, Abramson SB: Nitric Oxide A novel mediator of inflammation. Proc Soc Exp Biol Med. 1995; 210: 93-101

7. Hamid Q, Springall DR, Riverros M, Chanez P: Introduction of nitric Oxide synthase in asthma. Lancet. 1993; 342: 1510-1513

8. Kobzik L, Bredt DS, Lowenstein CJ, Drazen J: Nitric Oxide synthase in human and rat lung. immunocytochemical and histochemical localization. Journal of Respiratory Cell. Mol Biol. 1993; 9: 371-377

9. Liew FY, Li Y, Severn A: A possible novel pathway of regulation by murin T helper type-2 (Th2) cells of Th1 cell activity via the modulation of the induction of nitric Oxide synthase on macrophages. Eur J Immunol. 1991; 21: 2489-2494

10. Leal LMCC, Moss DW, Kuhn R, Muller W, Liew FY: Interleukin-4 transgenic mice of resistance background are susceptible to Lieshmania major infection . Eur J of Immunology, 1993; 23: 566-569

11. Cunha FQ, Moncada S, Liew FY: Interleukin-10 (IL-10) Inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. Bioch And Biophy Res Communi. 1992; 182: 1152-1159

12. Dind AH, Nathan CF, Graycar J, Derynck R, Stuehr DJ, Srimal S: Macrophage deactivation factor and transforming growth factor – beta 1, beta 2 and beta 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN-gmma. J Immunology. 1992; 145: 940-944

13. Cunha FQ, Weiser WY, David JR, Moss DW, moncada S, Liew FY: Recombinant migration inhibitory factor induce nitric Oxide synthase in murine macrophages. J immunology. 1993; 150: 1908-1912

14. Wu J, Cunha FQ, Liew FY, Weishui YW: IL-10 inhibits the synthesis of migration inhibitory factor and migration inhibitory factor- mediated macrophage activation. J Immunology, 1993; 151(8): 4325-4332

15. Ahmadi–Renani K, McCruden AB: Sex differences in macrophage nitic oxide production. Iranian Journal of Medical Sciences. 1997; 23(1&2): 42-46

16. Di-Rosa M, Radomski M, Carnuccio R, Moncada S: Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages. Bioche. & Biophy. Rese. Commu. 1990; 172 (3): 1246-1252

17. Chao TC, Van Alten PJ, Walter RJ: Steroid sex hormones and macrophage function : Modulation of reactive oxygen intermediates and nitric oxide release . American Journal of Reproductive Immunology 1994; 32: 43-52

18. Savita RU: Sex steroid hormones modulate the activation of murine peritoneal macrophages: Receptor Mediated Modulation. Comparative Biochemistry and physiology part C: Pharmacology Toxicology & Endocrinology. 1998; 119(2): 199-204

19. Friedl R, Brunner M, Moeslinger T, Spieckermann PG: Testosterone inhibits expression of inducible Nitric Oxide synthase in murine macrophages. Life Sciences. 2000; 68 (4): 417-429

20. Ahmadi-Renani K, McCruden AB: Effect of five alpha dihydrotestosterone (5α- DHT) on cytokine production by Peritoneal Macrophages of NZB/BALBc mice.

Archive of SID

www.SID.ir

Medical J. of the Islamic Republic of Iran. 1997; 11(3): 223-228

21. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA: Nitric oxide: Physiology ,pathophysiology and pharmacology. Pharmaco Rev. 1991; 43(2): 109-141

22. Farrel AJ, Blake DR, Palmer RMJ, Moncada S: Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic disease. Annas of the rheumatic disease. 1992; 51: 1219-1222

23. Green LC, Wagner DA, Glowgowski J, Skipper PL, Wishnok JJ, Tannenbaum SS: Analysis of Nitrate , nitrite and {^{15}N}Nitrate in Biological Fluids. Analytical Biochemistry, 1982; 126: 131-138

24. Woodfork KA, Schuller KC, Huffman LJ: Cytokine and nitric oxide release by J774A.1 macrophages is no regulated by estradiol. Life Sci 2001; 69(19): 2287-2294

25. Enomoto N, Takei Y, Kitamura T, Hirose M, Ikejima K, Sato N; Estradiol enhances lipopolysaccharide-induced increase in nitric Oxide production by Kupffer cells Via mechanisms dependent on endotoxin. Alcohol Clin Exp Res. 2002; 26(8 suppl): 66-69

26. You HJ, Kim JY, Jeong HG: 17 beta-estradiol increases inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. Biochem Biophys Res Commun. 2003; 303(4): 1129-1134

27. Ahmadi-Renani K, McCruden AB: Five Alpha Dihydrotestosterone (5α-DHT) may modulate Nitric Oxide release Via endogenous cytokines by peritoneal macrophages of NZB/BALBc Mice. Medical J. of the Islamic Republic of Iran. 1999; 13(3): 207-211

28. Grasemann H, Ioannidis IM, omkie Wicz RP, De Groot H, Rubin BK, and Ratjen F: Nitric Oxide metabolites in cystic Fibrosis lung disease. Archives of Disease in childhood (NLM-medline), 1988; 78: 49-53

29. Dean Sheppard .(2001). integrin mediated activation of transforming growth factor-â1 in pulmonary fibrosis Chest: 2001; 120: 49-53

Archive of SID

www.SID.ir