Archive of SID

مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۱ ، شماره ۲ ، تابستان ۱۳۸۵
صفحات: ۱۵۵- ۱۶۱

اثر ویتامین E در دوام بقاء ماکروفاژها وتولید نیتریک اکساید

کاظم احمدی* Ph.D. ، فاطمه عرب سلمانی* B.Sc.

چکیـده

هدف: تعیین اثر ویتامین E بعنوان یک آنتی اکسیدانت بر دوام بقاء سلول و ترشح NO .

روش بررسی: ماکروفاژهای صفاقی موش را به روش شستشوی صفاق با PBS (بافر فسفات) سرد بیـرون آورده و پس از شستشو و شمارش، سوسپانسیون سلولی در میحط کشت تهیه شد. تعـداد $1X10^5$ سـلول در حجم ۰/۲ میلی لیتر محیط کشت کامل به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه اضافه شد. پلیت‌ها ۲ سـاعت در شـرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO_2 انکوبه شده و پس از آن به منظور حذف سلولهای غیر ماکروفاژی سه بار بـا PBS گرم شسته شدند. مجددا به سلولها محیط کشت کامل حاوی/فاقد LPS در حضور یا غیاب ویتـامین E اضافه شد و در شرایط فوق حداکثر تا ۵ روز انکوبه شدند. محیط کشـت ماکروفاژهـا در روزهـای مختلـف اضافه یا تعویض شد. دوام بقاء سلولی با ترپن بلو و مقدار نیتریت بعنوان اندیکاتوری از NO به روش گریس اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که در حالت عادی با افزایش روزهای انکوباسیون مرگ سلولی افزایش مـی‌یابـد در حالیکه در حضور ویتامینE مـرگ سلولی کاهـش دارد (P<۰/۰۲). درغیاب ویتامینE حداکثر تولید نیتریت در ۴۸ ساعت اول بوده و در زمانهای بعدی کاهش یافته است. تعـویض یـا اضـافه کـردن محـیط کشـت در روزهای مختلف با افزایش نیتریک اکساید همراه بوده است. ولی تعویض یا اضافه کـردن محـیط کشـت در روزهای اولیه اثر بهتری بر ترشح آن داشته است. در حضور ویتامین E ترشح نیتریک اکساید کـاهش داشـته ولی دوام بقاء سلولی افزایش داشت.

نتیجه‌گیری: مرگ سلولی با گذشت زمان می تواند به دلیـل اتمـام محـیط کشـت و همچنـین اثـر سـایتو توکسیسیته نیتریت بر خود ماکروفاژ ها باشد و به نظر می‌رسد که ویتامین E با کاهش تولید نیتریک اکسـاید بر دوام بقاء سلولی اثر داشته باشد

واژه‌های کلیدی: ماکروفاژ، بقاء سلول، نیتریک اکساید، ویتامین E ، مرگ سلول

مقـدمـه

ماکروفاژهـا بـا ترشـح مـواد پـیش التهـابی، مولکولهـای تنظـیم کننـــده ایمنـــی، پـــردازش آنتـــی ژن، فاگوســـیتوز، ترشـــح واسـطه‌هـای وابسـته بـه اکسـیژن نظیـر سـوپر اکسـاید (۱) و نیتـروژن نظیـر نیتریـک اکسـاید نقـش مهمـی در دفـاع دارنـد. (۳،۲) نیتریک اکسـاید بوسـیله آنـزیم نیتریـک اکسـاید سـنتتاز از اسـید آمینـه ال- آرژینـین توسـط طیفـی از سـلولهای ایمنـی از جملـه ماکروفاژهـا بعنـوان منبـع اصـلی تولیـد شـده و سـریع بـه متابولیتهـای نیتریـت و نیتـرات تبـدیل مـی‌شـود. (۴) تولیـد آنهـا توسـط ماکروفاژهـا بـه سـه دلیـل مهـم اسـت: تولیـد آن تحـت

دریافت مقاله: ۸۴/۹/۲۲، اصلاح مقاله: ۸۵/۵/۲۰، پذیرش مقاله: ۸۵/۶/۱۵

نویسنده مسئول: استاد گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج)، و مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، تهران ـایران
* گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج)
آدرس پست الکترونیکی: K.ahmadi@bmsu.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

کنترل ایمونولوژیکی است. تولید آن تحت کنترل آنزیمی است و بالاخره اینکه نقش مهمی علیه تومورها و میکروب‌ها دارد. (۵) نیتریک اکساید علاوه بر خواص فوق به نظر می‌رسد که بر خود ماکروفاژها نیز اثر سایتو توکسی‌سیتی (۶) و یا کاهش بقاء عمر داشته باشد. (۷-۹) بنابر این تولید نیتریک اکساید علاوه بر اثرات سایتوتوکسیکی و سایتواستاتیک علیه میکرو ارگانیز مهای مهاجم و سلولهای سرطانی اثرات سمی روی سلول تولید کننده و یا سلولهای مجاور آن دارد.

مطالعات نشان داده که اکسیدانهایی نظیر رادیکالهای آزاد عامل آسیب سلولی و سوق دادن سلولهای منو نوکلئر ، لنفوسیتها و سلولهای ماکروفاژی U937 به سمت مرگ برنامه‌ریزی شده (آپوپتوزیس) می‌باشند. (۱۰)

Chow و همکاران (۱۱) نیز نشان داده‌اند که متابولیتهای نیتریک اکساید نظیر نیتریت و نیترات عامل ایجاد مت هموگلوبینمیا بوده و احتمالاً از طریق اتصال به بعضی آمینها باعث تشکیل نیتروز آمینهای کارسینوژنیک می‌شوند. ویتامین E یک آنتی اکسیدان است که باعث شکار رادیکالهای آزاد از جمله نیتریک اکساید می‌شود. (۱۳،۱۲) مطالعات کومار نشان داده که Trolox یکی از آنالوگهای محلول در آب ویتامین E باعث دوام بقاء سلول پس از آلودگی استنشاقی به خردل شده و منجر به کاهش اکسیداسیون لیپید می‌شود. (۱۴،۱۳)

بعضی از مطالعات نشان داده که ویتامین E فعالیت سیکلو اکسیژناز را در ماکروفاژها مهار می‌کند. (۱۵) هدف از این مطالعه بررسی بقاء سلولهای ماکروفاژی در کشت سلولی، ارتباط احتمالی آن با تولید نیتریک اکساید و نقش ویتامین E بعنوان یک آنتی اکسیدانت و شکار کننده نیتریک اکساید در بقاء سلولی و تولید نیتریک اکساید می‌باشد. به منظور مقایسه اثر محیط کشت تازه نیز بررسی شد.

روش بررسی

۱. تهیه ماکروفاژ و کشت آنها . ماکرو فاژهای صفاقی از موشهای سوری تهیه شد. برای این کار مقدار ۵-۸ میلی لیتر PBS سرد بداخل صفاق هر موش تزریق شد. پس از ماساژ آهسته به منظور رهایش سلولها از جداره صفاق با پیپت پاستور مخصوص سلولهای صفاقی برداشته و به لوله‌های از قبل آماده بر روی یخ انتقال یافتند. به منظور اجتناب از چسبندگی سلولها، تمام مراحل در شرایط روی یخ انجام شد. سلولها ۳ بار با PBS سرد شسته شده و نهایتاً پس از شمارش سلولها، سوسپانسیون سلولی در محیط RPMI ۱۶۴۰ (Sigma Co.) بدون فنول رد تهیه گردید. (۱۶) تعداد $1X10^5$ سلول در حجم ۰/۲ میلی لیتر محیط کشت کامل {حاوی۱۰٪- Fetal Calf Serum- FCS و آنتی بیوتیک به مقدار ۵۰ میکروگرم استرپتومایسین و ۵۰ واحد پنی سیلین در میلی لیتر} به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه اضافه گردید. سلولها بمدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد، ۵٪ CO_2 انکوبه شدند. به منظور رهایی از سلولهای غیر ماکروفاژی پس از ۲ ساعت مایع رویی هر چاهک پلیت بآهستگی بیرون ریخته شد و هر چاهک سه بار با PBS گرم بآرامی شسته شد. به هر چاهک حاوی ماکروفاژ (سلولهای چسبیده به کف پلیت) مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر از محیط کشت کامل RPMI ۱۶۴۰ بدون فنول رد حاوی ۱۰ میکرو گرم LPS اضافه شد. (۱۷) در پلیت‌های جداگانه مقدار ۰/۲ میلی لیتر محیط کشت بدون LPS اضافه شد.

۲. شمارش سلولهای زنده . بطور روزانه پلیت مورد نظر را در محیط سرد قرار داده و بمدت چند دقیقه تکان ملایم داده شد تا سلولها از ته پلیت کنده شدند. مقدار ۵۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون سلولی با هم حجم ترپن بلو ۰/۴ درصد مخلوط و با میکروسکوپ نوری تعداد درصد سلولهای زنده در ۶ میدان میکروسکوپی شمارش شد (n=6).

۳. اندازه‌گیری نیتریک اکساید . نیتریک اکساید ماده‌ای است بسیار ناپایدار و سریعا به نیتریت و نیترات تبدیل می‌شود. لذا مقدار نیتریت بعنوان اندیکاتوری از نیتریک اکساید به روش گریس اندازه‌گیری شد. (۱۶) بطور خلاصه مقدار ۵۰ میکرولیتر از مایع رویی هر چاهک با ۵۰ میکرو لیتر از ماده گریس (1% Sulphanilamid, 0.1% N-1-Naphtylethylenediamine hydrochloride, و

www.SID.ir

Archive of SID

PO_4H_3 2.5%) مخلوط و پس از ۱۰ دقیقه انکوبه شدن در حرارت اتاق جذب نوری (OD) رنگ تولیدی بوسیله ریدر (Micro plate multiscan) در ۵۴۰ نانو متر علیه بلانک قرائت و با استفاده از غلظتهای مختلف نیتریت سدیم بعنوان منحنی استاندارد مقدار نیتریت بر حسب نانو مولار محاسبه شد.

۴. اثر محیط کشت و LPS بر بقاء عمر سلول . به منظور بدست آوردن اثر ویتامین E بر بقاء عمر سلول لازم بود که اثر محیط کشت کهنه حاوی متابولیتهای مترشحه از خود سلول و همچنین اثر احتمالی LPS موجود در محیط کشت نیز بررسی شود. برای این کار:

الف. پس از بدست آوردن غلظت مناسب ویتامینE (۱۰ میکروگرم) در یک تجربه مقدار نیتریت و درصد سلول زنده روزانه بمدت ۵ روز در حالی که محیط کشت اولیه فاقد LPS بود و بدون تعویض روزانه محیط کشت بررسی شد. بدین ترتیب که ماکروفاژها در محیط کشت کامل بدون LPS کشت داده شدند. یک گروه از چاهکهای سلولی (۶ چاهک) فاقد ویتامین E بود. به گروه دیگر چاهکهای سلولی (۶ چاهک) مقدار ۱۰۰ میکرو گرم ویتامینE به ازای هر میلی لیتر محیط کشت اضافه شد. پلیتها بمدت ۵ روز در شرایط گفته شده در بند۲ انکوبه شدند. مقدار نیتریت و در صد سلولهای زنده مانند بند ۳و۴ فوق روزانه اندازه‌گیری و یا شمارش شد.

ب. در یک تجربه مقدار نیتریت و درصد سلول زنده روزانه بمدت ۵ روز در حالی که محیط کشت اولیه حاوی۱۰ میکروگرم (به ازای هر میلی لیتر محیط کشت) LPS بود و بدون تعویض روزانه محیط کشت بررسی شد. بدین ترتیب که ماکروفاژها در محیط کشت کامل حاوی۱۰ میکروگرم (به ازای هر میلی لیتر محیط کشت) LPS کشت داده شدند. به یک گروه از چاهکهای سلولی (۶ چاهک) ویتامین E اضافه نشد و به گروه دیگر چاهکهای سلولی (۶ چاهک) مقدار ۱۰۰ میکرو گرم ویتامینE به ازای هر میلی لیتر محیط کشت اضافه شد. مقدار نیتریت و در صد سلولهای زنده مانند بند ۳ و ۴ فوق اندازه‌گیری و یا شمارش شد.

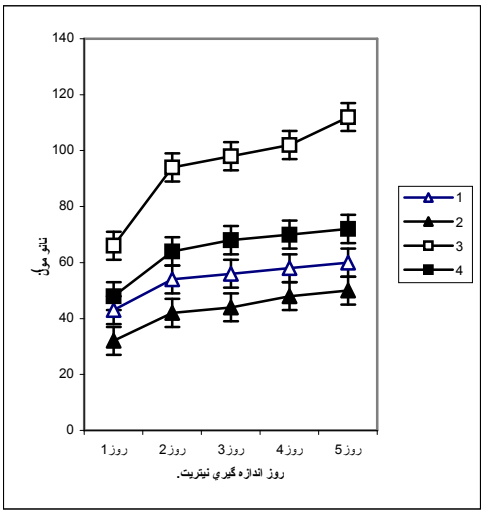
۵. اثر تعویض محیط کشت بر بقاء عمر سلولی . با توجه به نتایج حاصل از بند ۴ فوق و مشاهده این نکته که اختلاف معنی‌داری در دوام عمر سلولهای زنده در حضور یا فقدان LPS بدست نیامد (تفاوت در نیتریت معنی‌دار بود P<۰/۰۲). لذا در این تجربه آزمایشات فقط در حضور LPS انجام شد. بدین منظور به تمام چاهکهای سلولی دو گروه مورد مطالعه ۰/۲ میلی لیتر محیط کشت حاوی LPS اضافه شد. به چاهک‌های سلولی یک گروه مقدار ۱۰۰ میکرو گرم ویتامینE به ازای هر میلی لیتر محیط کشت اضافه شد. چاهکهای سلولی گروه دیگر بدون ویتامینE بودند. پلیتها بمدت ۱ روز (۲۴ ساعت) در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO_2 انکوبه شدند. پس از آن مایع رویی تمام چاهکها بطور جداگانه جهت اندازه گیری مقدار نیتریت برداشت شدند. در اینجا یک سری از چاهکها که از قبل پیش بینی شده بودند مانند بند ۳ درصد سلولهای زنده در آنها شمارش شدند. به سایر چاهک‌ها مجدداً مقدار ۰/۲ میلی لیتر محیط کشت کامل حاوی LPS در حضور و یا غیاب ویتامین E اضافه و بمدت یک روز دیگر در شرایط فوق انکوبه شدند. پس از آن مانند حالت فوق مایع رویی جهت اندازه‌گیری نیتریت و سلولهای ته پلیت جهت شمارش در صد سلول زنده برداشت شدند. این عمل به صورت مشابه تا ۵ روز تکرار شد.

یافته‌ها

شکل‌های ۱ و ۲ تفاوت معنی‌داری را در روزهای مختلف کشت سلولی در سطح نیتریت و بقاء سلولی در حضور یا عدم حضور ویتامین E نشان می‌دهد. هر چند ویتامین E در تمام روزها باعث بقاء عمر سلول شده ولی در مقایسه با گروه بدون ویتامین E در روز اول تاثیر معنی‌داری نداشته و حداکثر تاثیر در روز دوم و سوم بوده است. شکل ۱ همچنین نشان می‌دهد ویتامین E در تمام روزها باعث کاهش سطح نیتریت شده است. مقایسه شکل‌های ۱ و ۲ نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری در بقاء عمر سلول در

www.SID.ir

Archive of SID



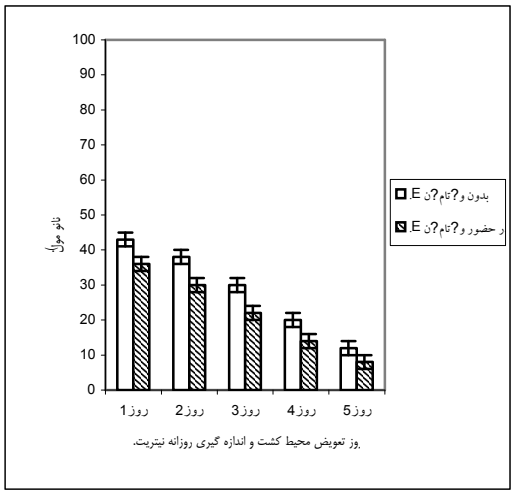
شکل ۱. ترشح نیتریک اکساید طی ۵ روز بدون تعویض محیط کشت در حضور یا غیاب ویتامینE (در دوحالت محیط اولیه فاقد LPS و یا حاوی LPS)

۱- ترشح نیتریک اکساید بدون ویتامینE (محیط کشت اولیه فاقدLPS).

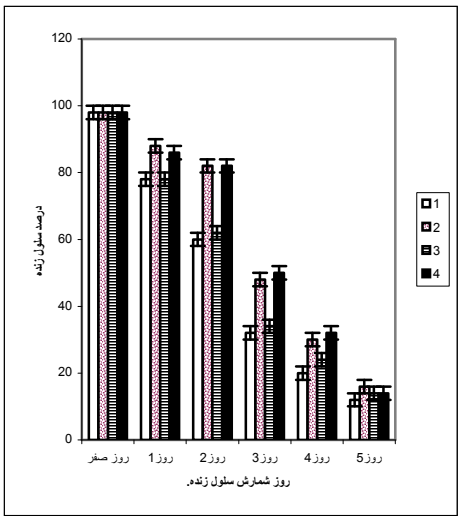
۲- ترشح نیتریک اکساید در حضور ویتامینE (محیط کشت اولیه فاقدLPS).

۳- – ترشح نیتریک اکساید بدون ویتامینE (محیط کشت اولیه حاویLPS).

۴- ترشح نیتریک اکساید در حضور ویتامینE (محیط کشت اولیه حاویLPS).



شکل ۳. ترشح نیتریک اکساید در ۵ روز جداگانه در حضور یا غیاب ویتامین E. (محیط کشت کهنه هر روز برداشت و محیط کشت تازه حاوی LPS در حضور یا غیاب ویتامین E اضافه شد. مقدار نیتریت روزانه اندازه گیری شد). N=6



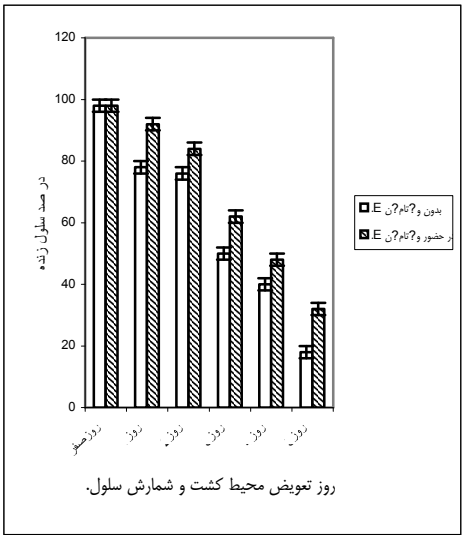
شکل ۲. درصد سلول های زنده طی ۵ روز بدون تعویض محیط کشت در حضور یا غیاب ویتامینE (در دوحالت محیط اولیه فاقد LPS و یا حاوی LPS)

۱- درصد سلول زنده بدون ویتامینE (محیط کشت اولیه فاقدLPS).

۲- درصد سلول زنده در حضور ویتامینE (محیط کشت اولیه فاقدLPS).

۳- درصد سلول زنده بدون ویتامینE (محیط کشت اولیه حاویLPS).

۴- درصد سلول زنده در حضور ویتامینE (محیط کشت اولیه حاویLPS).



شکل ۴. درصد سلول زنده در ۵ روز جداگانه در حضور یا غیاب ویتامین E. (محیط کشت کهنه هر روز برداشت و محیط کشت تازه حاوی LPS در حضر یا غیاب ویتامین E اضافه شد. درصد سلول زنده روزانه شمارش شد). N=6

حالتی که محیط کشت حاوی LPS و یا فاقد آن باشد دیده نمی‌شود (P<۰/۰۲). البته در حضور LPS میزان نیتریت بالاتر از

www.SID.ir

Archive of SID

حالتی است که LPS ندارد، ولی در بقاء عمر سلول تفاوت معنی‌داری دیده نشد. شکل ۱ نشان می‌دهد که باز هم ویتامین E در دوام بقاء سلول موثر بوده است. شکل ۳ نشان می‌دهد که در حالتی که در روزهای متعدد اول تا پنجم محیط کشت کهنه با محیط تازه تعویض شود مقدار نیتریک اکساید بیشتری ترشح می‌شود. شکل ۳ نشان می‌دهد که زمانی که هر روز محیط کشت کهنه با محیط کشت تازه عوض شود میزان بقاء سلول بیشتر بوده است (P<۰/۰۲). باز هم در این حالت حضور ویتامین E روزانه علاوه بر کاهش سطح نیتریت باعث افزایش دوام بقاء سلول شده است.

روش آماری . تمام آزمایشات ۶ بار تکرار شد (n=6) و داده‌های بدست آمده با نرم افزار SPSS و با استفاده از T-test آنالیز آماری شدند، (P<۰/۰۲) بعنوان تفاوت معنی‌دار قبول شد.

بحـــث

نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان می‌دهد که آنالوگ ویتامینE (Throlox) بر ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی موش اثر کاهشی دارد. ویتامینE در غلظت‌های ۱ الی ۶۴ میکرو گرم تفاوت معنی‌داری را بر ترشح نیتریک اکساید نشان نداد. در حالی که در صد سلولهای زنده در همین غلظت ویتامینE بیشتر از تعداد سلول زنده در گروه کنترل بود (داده‌ها نشان داده نشده است). بنابر این ویتامینE از یک طرف کاهش ترشح نیتریک اکساید را موجب شده است و از طرف دیگر باعث افزایش بقاء عمر سلول های ماکروفاژی شده است. نتایج حاصل از تعویض محیط کشت کهنه با محیط کشت تازه نشان داد که کهنه شدن محیط کشت عاملی در کاهش بقاء سلول بوده است. مرگ سلولی در محیط کشت کهنه می‌تواند بدلیل اتمام مواد غذایی و یا وجود متابولیت‌های سمی مترشحه از خود سلول باشد. با تعویض محیط کشت در روز های مختلف طی ۵ روز و اثر مثبتی که بر تعداد سلول زنده داشت می‌توان تصور نمود که یکی از علل مرگ سلولی و کاهش در صد سلول زنده در محیط کشت فقدان ماده غذایی سلول باشد. با توجه به اینکه تفاوت معنی‌داری در درصد سلول‌های زنده در محیط کشت تازه حاوی و یا فاقد LPS دیده نشد می‌توان گفت که نیاز به ماده محرک مثل LPS نمی‌تواند دلیل مرگ سلولی باشد هر چند جهت تولید نیتریک اکساید ضروری است. تحقیقات قبلی نشان داده که نیتریت موجود در محیط می‌تواند عاملی در تسریع مرگ سلولی باشد. (۱۱) یافته‌های ما در اینجا ارتباط مستقیم بین میزان ترشح نیتریک اکساید و مرگ سلولی را نشان نمی‌دهد ولی با توجه به اینکه ویتامین E از یک طرف باعث کاهش نیتریک اکساید شده و از طرف دیگر میزان بقاء سلولی را افزایش داده به نظر میرسد که ارتباطی بین این دو برقرار باشد . البته هنوز زود است که بگوییم آیا ویتامین E بطور مستقیم و مستقل، از یک طرف باعث کاهش نیتریک اکساید شده و از طرف دیگر باعث افزایش بقاء سلولی شده و یا اینکه بقاء سلولی رابطه مستقیم با مقدار نیتریک اکساید دارد (حداقل در سلولهای ماکروفاژی و نه سلولهای دیگر). در این رابطه تحقیقات قبلی (۱۱) نشان داده که اکسیدانت‌هایی نظیر رادیکالهای آزاد عامل آسیب سلولی و سوق دادن سلولهای منو نوکلئر ، لنفوسیتها و ماکروفاژها به سمت مرگ برنامه‌ریزی شده می‌باشد. (۱۰) در این رابطه Galli و همکارانش نشان داده‌اند که رادیکالهای آزاد باعث آسیب بافتی در سلولهای U937 شده و ویتامین E بعنوان یک آنتی اکسیدانت باعث محافظت سلولها در برابر مرگ می‌شود. مطالعات همچنین نشان داده که سلنیوم برای کشت سلول لازم بوده و با کاهش رادیکالهای آزاد نظیر متابولیت‌های وابسته به اکسیژن بقاء سلول را در محیط کشت افزایش می‌دهد. (۱۸)

Saiti و همکارانش (۱۸) همچنین ثابت نمودند که در فقدان سلنیوم مرگ سلولی افزایش یافته و ویتامین E اثرات فقدان سلنیوم را کاهش داده و باعث بقاء عمر سلول شده است. Poliandoil و همکاران (۱۹) نیز رابطه رادیکالهای آزاد و کادمیوم را نشان داده و ثابت کرده که کادمیوم مرگ سلولی را افزایش داده و ویتامین E باعث مهار آسیب های ایجادی توسط کادمیوم می‌شود. در رابطه با یافته‌های ما در اینجا مطالعات جدید نشان داده (۱۱) که نیتریک اکساید تولیدی توسط ماکروفاژهای ریوی می‌تواند عامل آسیب بافتی در ریه باشد و ویتامین E بعنوان یک آنتی اکسیدانت

www.SID.ir

Archive of SID

باعث کاهش نیتریک اکساید و آسیب بافتی شده است. از طرفی Chow ثابت نموده (۱۱) که توکسی سیتی نیتریک اکساید بر روی سلولها بواسطه ترکیب NO با سوپر اکساید و تشکیل پراکسی نیتریت (-ONOO) می باشد و نقش ویتامین E در اینجا کنترل تولید NO و سوپر اکساید می‌باشد. با توجه به یافته‌های ما در اینجا و دیگران مبنی بر ارتباط بین آسیب سلولی ، افزایش رادیکالهای آزاد و نقش ویتامین E در محافظت سلول به نظر می رسد که افزایش تشکیل پراکسی نیتریت (-ONOO) ، کمبود ویتامین E و سلنیوم می‌تواند عامل مهمی در آسیب سلولی باشند.

نتیجه‌گیری. بنابر این به نظر می رسد که نقش ویتامین E در محافظت سلول بواسطه توانایی آن در کاهش تشکیل پر اکسی نیتریت باشد. Beharka نیز ثابت کرده (۱۵) که ویتامین E از طریق کاهش پراکسی نیتریت فعالیت سیکلو اکسیژناز را در ماکروفاژها مهار می کند.

تقدیر و تشکر. از دانشکده پزشکی به جهت در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاه و حیوان مورد نیاز و دانشجویان کارشناسی ارشد گروه میکروب‌شناسی تشکر می‌گردد.

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. Stuehr DJ, Marletta MA. Mammalian nitrate biosynthesis: Mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherchia coli Lipopolisaccaride. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985; 82: 7738-42.

5. Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for indipendent production. J Immunol 1988; 141(1): 2407-12.

6. Assreuy J, Cunha FQ, liew FY, Moncada S. Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. Br J pharmacol 1993; 108: 833-37.

7. Albina JE, Caldwell MD, Henry WL, Mills CD. Regulation of Macrophage functions by L-arginine. J Exp Med 1989a; 169: 1021-1029.

8. Albina JE, Mills CD, Henry WL, Caldwell MD. Regulation of macrophage physiology by L-arginine: Role of the oxidative L-arginine deiminase pathway. J Immunol 1989b; 143: 3641-46.

9. Drapier JC, Hibbs JB Jr. Murine citotoxic activated macrophages inhibit aconitase in tumor cells. Inhibition involves the ion-sulphur prosthetic group and is reversible. J Clini Invest 1986; 78(3): 790-797.

10. Galli F, Ghibelli L, Buoncristiani U, Bordoni V, D'Intini V, Benedetti S, Canestrari F, Ronco C, Floridi A. Mononuclear leukocyte apoptosis in haemodialysis patients: the role of cell thiols and vitamin E. Nephrol Dial Transplant 2003; 18(8): 1592-600.

11. Chow CK, Hong CB. Dietary vitamin E and selenium and toxicity of nitrite and nitrate. Toxicology 2002; 180(2): 195-207.

12. Nakayma T, Kodama M, Nagata C. Free radical formation in DNA by lipid peroxidation. Agric. Biol

www.SID.ir

Archive of SID

Chem 1984; 48: 571-78.

13. Lakshaman Rao PV, Vijayaraghavan R, Bhaskar ASB. Sulphur mustard induced damage in mice after dermal and inhalation exposure. Toxicol 1999; 139: 39-51.

14. Kumar O, Sugendran K, Vijayaraghvan R. Protective effect of various antioxidants on the toxicity of sulphur administered to mice by inhalation or percutanous routes. Chemico-Biological Interactions 2001; 134: 1-12.

15. Beharka AA, Wu D, Serafini M, Meydani SN. Mechanism of vitamin E inhibition of cyclooxygenase activity in macrophages from old mice: role of peroxynitrite. Free Radic Biol Med 2002; 32(6): 503-11.

16. 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: 131-38.

17. Ahmadi – Renani K, McCruden AB. Sex differences in macrophage nitric oxide production. Iranian Journal of Medical Sciences 1998; 23(1&2): 42-47.

18. Saito Y, Yoshida Y, Akazawa T, Takahashi K, Niki F. Cell death caused by selenium deficiency and protective effect of antioxidants. J Biol Chem 2003; 278(41): 39428-34.

19. Poliandri AH, Cabilla JP, Velardez MO, Bodo CC, Duvilanski BH. Cadmium induces apoptosis in anterior pituitary cells that can be reversed by treatment with antioxidants. Toxicol Appl Pharmacol 2003; 190(1): 17-24.

www.SID.ir